



Уральский
федеральный
университет

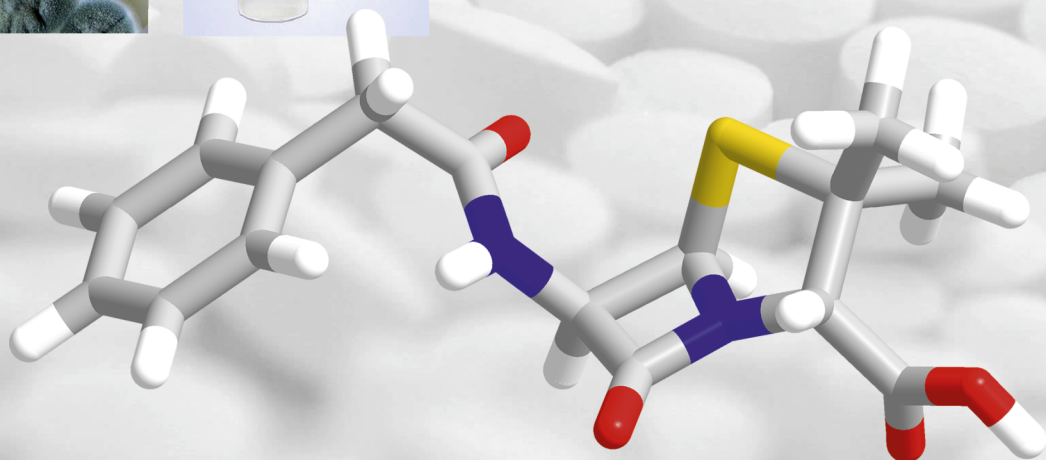
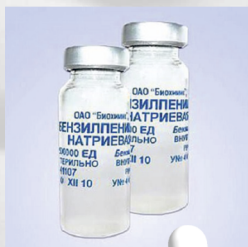
имени первого Президента
России Б.Н. Ельцина

Химико-
технологический
институт

**Т. В. ГЛУХАРЕВА
И. С. СЕЛЕЗНЕВА
Е. Н. УЛОМСКИЙ**

ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

Учебное пособие



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ПЕРВОГО ПРЕЗИДЕНТА РОССИИ Б. Н. ЕЛЬЦИНА

Т. В. Глухарева, И. С. Селезнева, Е. Н. Уломский

ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

Учебное пособие

Рекомендовано методическим советом
Уральского федерального университета в качестве учебного пособия
для студентов вуза, обучающихся по направлению подготовки
19.03.01 «Биотехнология»

Екатеринбург
Издательство Уральского университета
2021

УДК 577.18(075.8)

ББК 28.07я73-1

Г55

Рецензенты:

Г. Л. Русинов, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник

(Институт органического синтеза УрО РАН);

О. Е. Черепанова, кандидат биологических наук,

старший научный сотрудник лаборатории популяционной биологии
древесных растений и динамики леса (Ботанический сад УрО РАН)

Глухарева, Т. В.

Г55

Основы получения и применения антибиотиков : учебное пособие / Т. В. Глухарева, И. С. Селезнева, Е. Н. Уломский ; Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, Уральский федеральный университет. — Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2021. — 150 с. : ил. — Библиогр.: с. 149. — 100 экз. — ISBN 978-5-7996-3190-1. — Текст : непосредственный.

ISBN 978-5-7996-3190-1

Учебное пособие посвящено изучению теоретических основ применения и получения антибиотиков. В нем подробно рассматриваются основные классы антибиотиков, строение, физико-химические и биологические свойства, механизм действия, применение в лечебной практике и промышленные способы получения наиболее важных антибиотиков. Большое внимание уделяется связи между структурой и биологическим действием препаратов.

Пособие может быть полезно будущим специалистам в области разработки, проектирования и производства биологически активных веществ.

УДК 577.18(075.8)

ББК 28.07я73-1

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие.....	5
1. Понятие об антибиотиках.....	6
2. История открытия антибиотиков.....	7
3. Классификация антибиотиков.....	12
4. Общие сведения о действии антибиотиков.....	13
4.1. Механизмы биологической активности антибиотиков.....	13
4.2. Резистентность микроорганизмов к антибиотикам.....	16
5. Значение антибиотиков в жизнедеятельности микроорганизмов-продуцентов.....	17
5.1. Механизмы защиты микроорганизмов от вырабатываемых ими антибиотиков.....	18
5.2. Роль антибиотиков в жизнедеятельности собственных продуцентов.....	19
6. Антибиотики различных классов.....	21
6.1. Пенициллины.....	21
6.1.1. Природные пенициллины.....	22
6.1.2. Неприродные пенициллины.....	31
6.1.3. Связь строения пенициллинов с антибиотическими свойствами.....	48
6.2. Цефалоспорины.....	52
6.2.1. Природные цефалоспорины.....	52
6.2.2. Полусинтетические цефалоспорины и их получение.....	53
6.2.3. Связь химической структуры и биологического действия цефалоспоринов и цефамицинов.....	69
6.3. Ингибиторы β -лактамаз.....	73
6.3.1. Требования к потенциальным ингибиторам β -лактамаз.....	75
6.3.2. β -Лактамазостабильные пенициллины и цефалоспорины.....	76
6.3.3. Специфические ингибиторы.....	76
6.4. Карбапенемные, пенемные и моноциклические β -лактамные антибиотики — нетрадиционные β -лактамы.....	79
6.4.1. Карбапенемы.....	79
6.4.2. Пенемы.....	81
6.4.3. Моноциклические β -лактамные антибиотики.....	82

6.5. Антибиотики аминогликозиды.....	85
6.5.1. Природные стрептомицины.....	86
6.5.2. Неприродные стрептомицины.....	91
6.5.3. Зависимость антибиотического действия стрептомицинов от их строения.....	93
6.5.4. Стрептомициноподобные антибиотики. Аминогликозиды, содержащие 2-дезоксистрептамин.....	94
6.5.5. Зависимость антибиотического действия стрептомициноподобных антибиотиков от их строения.....	102
6.6. Тетрациклины.....	103
6.6.1. Природные тетрациклины.....	104
6.6.2. Неприродные тетрациклины.....	108
6.6.3. Связь между структурой и функцией в ряду тетрациклинов.....	116
6.7. Макролиды.....	117
6.7.1. Макролиды 1-го типа. Противогрибковые макролиды-полиены.....	117
6.7.2. Макролиды 2-го типа.....	123
6.7.3. Новейшие макролиды — производные эритромицина, азалиды. Цели при создании новейших макролидов.....	129
6.8. Антибиотики полипептиды.....	134
6.8.1. Грамицидины.....	135
6.8.2. Полимиксины.....	136
6.8.3. Бацитрацины.....	138
6.8.4. Актиномицины.....	139
6.8.5. Блеомицины.....	139
6.9. Анзамицины.....	139
7. Измерение биологической активности антибиотиков.....	145
Заключение.....	147
Библиографические ссылки.....	148
Библиографический список.....	149

ПРЕДИСЛОВИЕ

На современном этапе развития цивилизации ведущая роль в химиотерапии инфекционных заболеваний принадлежит антибиотикам. Наряду с этим не менее важное значение антибиотики имеют в сельском хозяйстве, ветеринарии и других областях экономики. С 90-х гг. XX в. получение субстанций антибиотиков в России стало уменьшаться, а в настоящее время практически прекратилось, и производство антибиотиков связано в основном с выпуском готовых лекарственных форм. Импорт субстанций антибиотиков осуществляется главным образом из Китая и Индии. Несмотря на сложившуюся ситуацию, производство субстанций и готовых лекарственных форм антибиотиков имеет стратегическое значение для обеспечения населения России отечественными лекарственными препаратами. В последние годы правительство России уделяет большое внимание развитию фармацевтической промышленности, создавая целевые программы и стратегии ее развития («Фарма 2020» и «Фарма 2030»). Решение этой проблемы невозможно представить без подготовки высококвалифицированных специалистов в области организации производства лекарственных средств, в частности антибиотиков.

Настоящее учебное пособие позволяет получить базовые знания об антибиотиках и предназначено для формирования у обучающихся компетенций в области химии и технологии антибиотиков. В нем подробно рассматриваются особенности строения, биологических и химических свойств, механизмов действия и методов получения антибиотиков различных классов. Большое внимание уделяется вопросам биотехнологии производства антибиотиков.

Для успешного освоения рассматриваемого материала необходимо наличие у обучающихся знаний органической химии, микробиологии и теоретических основ биотехнологии.

Учебное пособие будет полезно студентам, аспирантам, преподавателям и молодым научным сотрудникам и специалистам, связанным с подготовкой и деятельностью в области производства лекарственных средств.

1. ПОНЯТИЕ ОБ АНТИБИОТИКАХ



Зельман Эйбрахам Ваксман
(1888–1973) — американский микробиолог. В 1952 г. был награжден Нобелевской премией по физиологии и медицине за открытие стрептомицина, первого антибиотика, эффективного при лечении туберкулеза

Название «антибиотики», предложенное в 1942 г. Зельманом Ваксманом [1], произошло от термина «антибиоз», введенного французским ученым Ж. Вильменом в 1889 г. (от лат. *anti* — против, греч. *bios* — жизнь). Этот термин был применен для обозначения антагонистических отношений, существующих между различными видами микроорганизмов, т. е. явления угнетения одних микроорганизмов другими. В процессе длительной эволюции микроорганизмов борьба за существование выработала у них различные способы защиты и агрессии. Одним из средств такой борьбы за жизненное пространство, пищу и воздух являются химические средства защиты и нападения, которые синтезируются и выделяются в ходе жизнедеятельности микроорганизмов. Вот эти вещества, применяемые в качестве лекарственных препаратов для

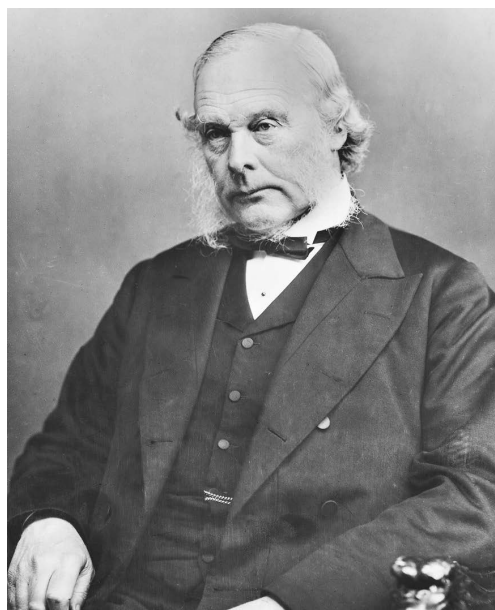
борьбы с инфекциями, и стали называться антибиотиками.

В настоящее время *антибиотиками* называют природные вещества (как правило, микробного, но также растительного и животного происхождения) и продукты их химической модификации, способные в низких концентрациях (10^{-3} – 10^{-2} мкг/мл) подавлять развитие бактерий, низших грибов, простейших или в некоторых случаях клеток злокачественных опухолей.

2. ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ АНТИБИОТИКОВ

Первые систематические наблюдения антагонизма в мире микроорганизмов и мысли о возможном использовании этого явления для лечения людей были сделаны в конце XIX в. Так, в 1871 г. Джозеф Листер [2] описал явление антагонизма между бактериями и плесенью рода *Penicillium*. Среди русских ученых приоритет в области изучения микробного антагонизма принадлежит врачам Военно-медицинской академии В. А. Манассеину и А. Г. Полотебнову. Работа В. А. Манассеина «Об отношении бактерий к зеленому кистевнику» вышла в 1871 г., а годом позже А. Г. Полотебнов опубликовал сообщение о результатах лечения гнойных ран порошком и суспензией спор грибов пенициллов и аспергиллов. В 1877 г. эти сведения были подтверждены П. В. Лебединским и позже, в 1904 г., М. Г. Тартаковским.

В те же годы И. И. Мечников [3] наблюдал антагонизм между молочнокислыми и гнилостными бактериями кишок. Преждевременное старение человека ученый связывал с интоксикацией организма продуктами жизнедеятельности гнилостных микробов и предложил употреблять молочнокислые продукты для подавления вредных гнилостных бактерий, находящихся в кишечнике человека. По результатам своих исследований он писал: «По всему нужно думать, что во внешней природе и в человеческом организме распространены микробы, оказывающие нам большую пользу в борьбе против заразных болезней» [4].



Джозеф Листер (1827–1912) — крупнейший английский хирург и ученый. Создал хирургическую антисептику

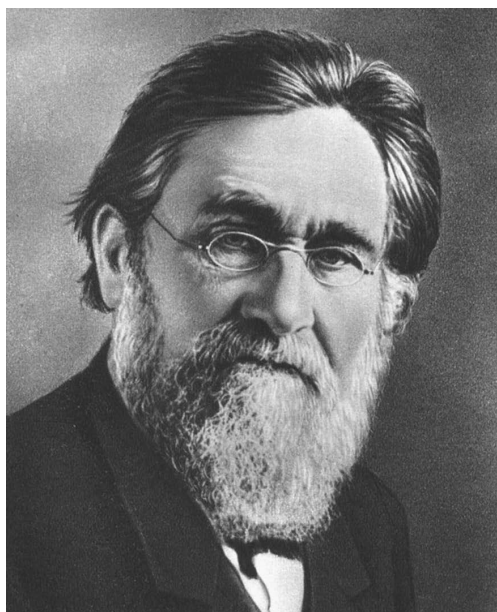
Начиная с 70-х г. XIX в. многие исследователи в России и за рубежом описывали свои наблюдения микробного антагонизма и предлагали использовать это явление для лечения ряда заболеваний. Постепенно накапливался опыт бактериотерапии.

Особенно велик вклад в развитие микробиологии и иммунологии Л. Пастера. Его фундаментальные открытия явились основой прогресса в области химиотерапии инфекций [5].

В 1885 г. румынский исследователь В. Бабеш предугадал, что антагонизм между бактериями обусловлен выделением в окружающую среду химических веществ, что именно химические вещества наносят ущерб бактериям другого вида.

Таким образом, идея «носила в воздухе», однако прошло еще более 40 лет, пока в 1928 г. английский врач и микробиолог Александр Флеминг ее реализовал.

А. Флеминг изучал культуру золотистого стафилококка [6]. Однажды он обнаружил, что в чашках Петри с культурой *St. aureus* выросли колонии зеленой плесени *Penicillium* и вокруг этих колоний образовались стерильные кольца, свободные от золотистого стафилококка [7]. Флеминг связал лизис культуры золотистого стафилококка с действием химического вещества, выделяемого зеле-



Илья Ильич Мечников (1845–1916) — русский и французский биолог. Лауреат Нобелевской премии в области физиологии и медицины



Луи Пастер (1822–1895) — выдающийся французский микробиолог и химик.

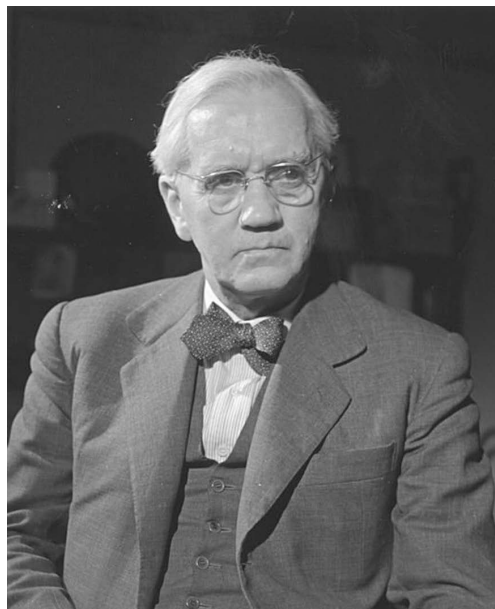
Один из основоположников микробиологии. Установил микробиологическую сущность брожения и многих болезней. Создатель научных основ вакцинации

ной плесенью, которое он назвал пенициллином. Флеминг поставил себе задачу выделить это соединение. Однако выделить чистое индивидуальное вещество Флемингу не удалось, и исследования *in vitro* и на подопытных животных *in vivo* были проведены им с питательным бульоном или водными средами, на которых выращивался гриб.

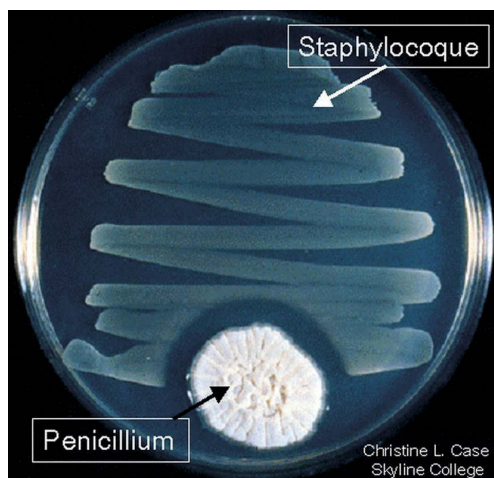
Даже в этих условиях, когда содержание действующего начала было очень мало, пенициллин показал высокую активность на патогенные стафилококки и стрептококки при практической безвредности.

В 1929 г. А. Флеминг опубликовал свои данные о чудодейственных свойствах пенициллина и высказал мысль использовать это вещество для лечения ран, зараженных чувствительными к пенициллину бактериями. Однако медики не заинтересовались этим открытием. Великое открытие нашло дорогу к людям во время Второй мировой войны.

В 1939 г. Говард Флори, заведовавший кафедрой патологии в Оксфорде, случайно увидел публикации Флеминга о пенициллине. Он поставил перед собой задачу выделить чистый пенициллин и пригласил принять участие в этом проекте Э. Чейни, Н. Г. Хитли и ряд других ученых (Оксфордская группа). Им удалось сконцентрировать антибиотик и частично очистить его. Активность пенициллина оказалась в 1 000 раз выше, чем в бульоне Флеминга и в 10 раз выше, чем сульфаниламидных препаратов. У пенициллина обнаружили дополнительную активность на возбудителя газовой гангрены, что имело большое значение в военное время. Решающие испыта-



Александр Флеминг (1881-1955) — английский бактериолог, впервые выделивший из плесневых грибов пенициллин — исторически первый антибиотик



Пример явления микробного антагонизма. Подобную картину наблюдал А. Флеминг

ния на зараженных мышах были проведены 1 июля 1940 г. в разгар наступления немцев, на людях — в августе 1942 г. Первым пациентом стал человек, умирающий от менингита, вызванного менингококком.

27 августа 1942 г. газета «Таймс» напечатала редакционную статью о чудодейственном свойстве пенициллина без упоминания имени А. Флеминга. Однако 31 августа в той же газете появилась заметка, утверждавшая, что первым пенициллин открыл Александр Флеминг.

Пенициллин Флеминга был получен из штамма *Penicillium notatum*, который выделял пенициллин в небольшом количестве. Для организации промышленного производства был необходим более эффективный продуцент.

В Америке к работе по поиску высокоэффективного продуцента привлекли Мэри Хант, которой было поручено совершать ежедневные обходы пекарен, булочных и сыроварен в поисках сине-зеленой плесени. Работники этих заведений прозвали девушку «плесневелой Мэри» и встречали ее крайне иронично. На сегодняшний день все штаммы плесневых грибов, продуцирующие целебный пенициллин, являются прямыми потомками той самой плесени, которую с усердием собирала Мэри Хант.

Организация промышленного производства пенициллина была осуществлена в Америке под руководством Говарда Хитли с использованием штамма плесени *Penicillium chrysogenum*. Несколько позже, в 1943 г., было организовано производство пенициллина в Англии. Полученный пенициллин с успехом применяли в армии для лечения раневых инфекций и гонореи.

В 1943 г. к Флемингу пришли слава и всемирная известность. Он был избран членом Лондонского королевского общества — ведущего научного общества Великобритании, а в 1945 г. Флемингу, Флори и Чейну была присуждена Нобелевская премия по медицине. К этому времени научились выделять кристаллический пенициллин. Он оказался в 10^6 раз активнее первоначальной культуральной жидкости Флеминга. С помощью пенициллина излечивали сепсис, менингит, туберкулезный менингит, считавшиеся раньше смертельными заболеваниями, а также пневмонию, различные формы ангин, рожистые воспаления и многие другие инфекционные заболевания, вызванные патогенными грамположительными бактериями.

Открытие пенициллина было случайным явлением, однако, по словам Луи Пастера, «случай обычно подготовлен определенным ходом мыслей, судьба одаривает только подготовленные умы» [8, с. 8].

Успех пенициллина был фантастическим! Он спас миллионы человеческих жизней. Так биологический феномен микробного антагонизма был впервые использован в медицине.

В 1943 г. в Советском Союзе под руководством выдающегося русского микробиолога Зинаиды Виссарионовны Ермольевой был получен пеницил-

лин из другого оригинального штамма — *Penicillium crustosum*. В последний год Великой Отечественной войны этот отечественный пенициллин начали применять в условиях полевых госпиталей под руководством академика Н. Н. Бурденко.

После открытия противобактериальных свойств пенициллина развитие химии антибиотиков шло взрывообразно: в течение нескольких лет из других родов микроорганизмов выделено большое количество высокоэффективных веществ. В медицине началась эра антибиотиков. Химия антибиотиков выросла в самостоятельную отрасль химии, а производство — в самую крупную подотрасль фармацевтической промышленности.

В настоящее время известно более 6 тыс. природных антибиотиков, из которых промышленность вырабатывает около 300 (ежегодно открываются 200–300 новых антибиотиков). Исследователи постоянно ищут источники новых антибиотиков. Поле деятельности — огромно, так как из 11 тыс. видов актиномицетов (лучистых грибов) на способность выделять антибиотики пока исследовано около 2 %, а именно актиномицеты являются главными продуцентами антибиотиков (70,3 % описанных антибиотиков — из актиномицетов). На втором месте стоят бактерии рода *Bacillus* (7 % известных антибиотиков), затем псевдомонады (1,3 %), а на долю всех остальных эубактерий приходится ~1,7 %. Небольшое количество антибиотиков образуют грибы, лишайники, высшие растения.

Антибиотики, внедрившиеся в медицинскую практику до 1960-х гг., сейчас называют антибиотиками 1-го поколения. В 1960-х гг. появились антибиотики 2-го поколения, получаемые путем полусинтеза, так называемые полусинтетические антибиотики, наконец, сейчас начинают входить в практику антибиотики 3-го и 4-го поколений.

3. КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ

Существует несколько принципов классификации антибиотиков.

Так, *по спектру биологической активности* антибиотики подразделяются: на антибактериальные, противогрибковые, противопротозойные, противоопухолевые и др. *По механизму биологического действия* выделяют антибиотики: ингибиторы синтеза клеточной стенки, ингибиторы матричного синтеза белка, нуклеиновых кислот, ингибиторы функционирования цитоплазматической мембраны и т. д. *По происхождению, или по продуценту* — антибиотики, продуцируемые актиномицетами, плесневыми грибами, бактериями и т. д. Существуют различные виды классификаций антибиотиков *по химическому строению*. Так, например, по классификации Д. Ланчини антибиотики делят на следующие большие семейства:

1. β -Лактамные антибиотики;
2. Аминогликозиды;
3. Тетрациклины;
4. Макролиды;
5. Полипептиды;
6. Анзамицины;
7. Прочие антибиотики.

Эта классификация включает в себя наиболее широко применяемые группы антибиотиков. В дальнейшем мы будем придерживаться данной классификации в представлении информации об антибиотиках.

4. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ДЕЙСТВИИ АНТИБИОТИКОВ

4.1. Механизмы биологической активности антибиотиков

Антибиотики не обладают универсальной биологической активностью, их действие на различные микроорганизмы характеризуется антимикробным спектром. Следует отметить, что антибиотики, имеющие близкое химическое строение, обладают сходным антимикробным спектром. Перечислим факторы, влияющие на характер и механизм биологического действия:

- химическая природа антибиотика;
- концентрация препарата;
- вид микроорганизма;
- структура клеток микроорганизма;
- условия проявления действия (оптимальные значения pH, температура) и др.

В зависимости от перечисленных факторов антибиотические лекарственные препараты проявляют цитостатическое действие (задерживают рост клеток), цитотоксическое действие (убивают клетки), цитолитическое действие (растворяют клеточную стенку, в результате происходит гибель клетки). Под механизмом действия антибиотиков понимают те изменения и нарушения в обмене веществ и биохимической деятельности клетки, которые вызываются препаратом и приводят к прекращению развития или гибели микроорганизма.

Антибиотики по механизму действия условно делят на следующие группы:

1. Антибиотики-ингибиторы синтеза клеточной стенки бактерий (пенициллины, цефалоспорины, бацитрацин, ванкомицин) и грибов (полиоксины, никкомицин).

2. Антибиотики, которые нарушают функции клеточных мембран (грамидины, кандицидины, нистатин, эндомицин, альбомицин, аскозин).

3. Антибиотики, подавляющие синтез РНК (актиномицин, гризеофульвин, оливомицин, канамицин) и ДНК (брунеомицин, актидион, саркомицин, новобиоцин).

4. Антибиотики-ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов (декоинин, азасерин, саркомицин).

5. Антибиотики, подавляющие синтез белка (канамицин, бацитрацин, виомицин, метимицин).

6. Антибиотики, ингибирующие энергетический метаболизм (олигомицины, антимицины, пиоцианин, усниновая кислота).

7. Антибиотики, ингибирующие окислительное фосфорилирование (граммицидины, олигомицин, валиномицин, колицины).

8. Антибиотики-антиметаболиты (пуромицин, ациодомицин).

9. Антибиотики-иммуномодуляторы (актиномицины С и Д, оливомицин, рубомицин, брунеомицин, циклоспорин).

Выделяют следующие механизмы действия антибактериальных антибиотиков:

1) бактерицидный (необратимое ингибирование синтеза клеточной стенки и функций цитоплазматической мембраны, происходит гибель чувствительных к ним микроорганизмов);

2) бактериостатический (ингибирование синтеза белков и нуклеиновых кислот, но при удалении антибиотика функции микроорганизма восстанавливаются);

3) сочетанное действие (ингибирование функции цитоплазматической мембраны, нарушение синтеза белков и нуклеиновых кислот). На рис. 1 представлены механизмы воздействия антибиотиков на бактериальную клетку и приведены примеры групп антибиотиков, действующих согласно тому или иному механизму [9].

Первым этапом взаимодействия антибиотика с микроорганизмами является адсорбция его клетками. После связывания с клеткой антибиотики могут проявлять двоякое действие — некоторые действуют как поверхностно-активные вещества, а другие проникают вглубь клетки и нарушают нормальное протекание метаболизма клетки. Гибель клеток микроорганизмов под действием поверхностно-активных антибиотиков вызвана повреждением механизма осмотического равновесия на поверхности клетки и накоплением молекул антибиотика на поверхности раздела «жидкая фаза — микробная клетка», нарушением проницаемости клеточной стенки. С другой стороны, при взаимодействии антибиотика с клеткой микроорганизма он может проникнуть в клетку и взаимодействовать с ферментами, регулирующими такие жизненно важные процессы, как синтез и поддержание структуры клеточной стенки, матричные биосинтезы, функции мембран и др.

Благодаря отличиям структуры белков и физиологических процессов у прокариот и у эукариот антибиотики сравнительно нетоксичны для человека.

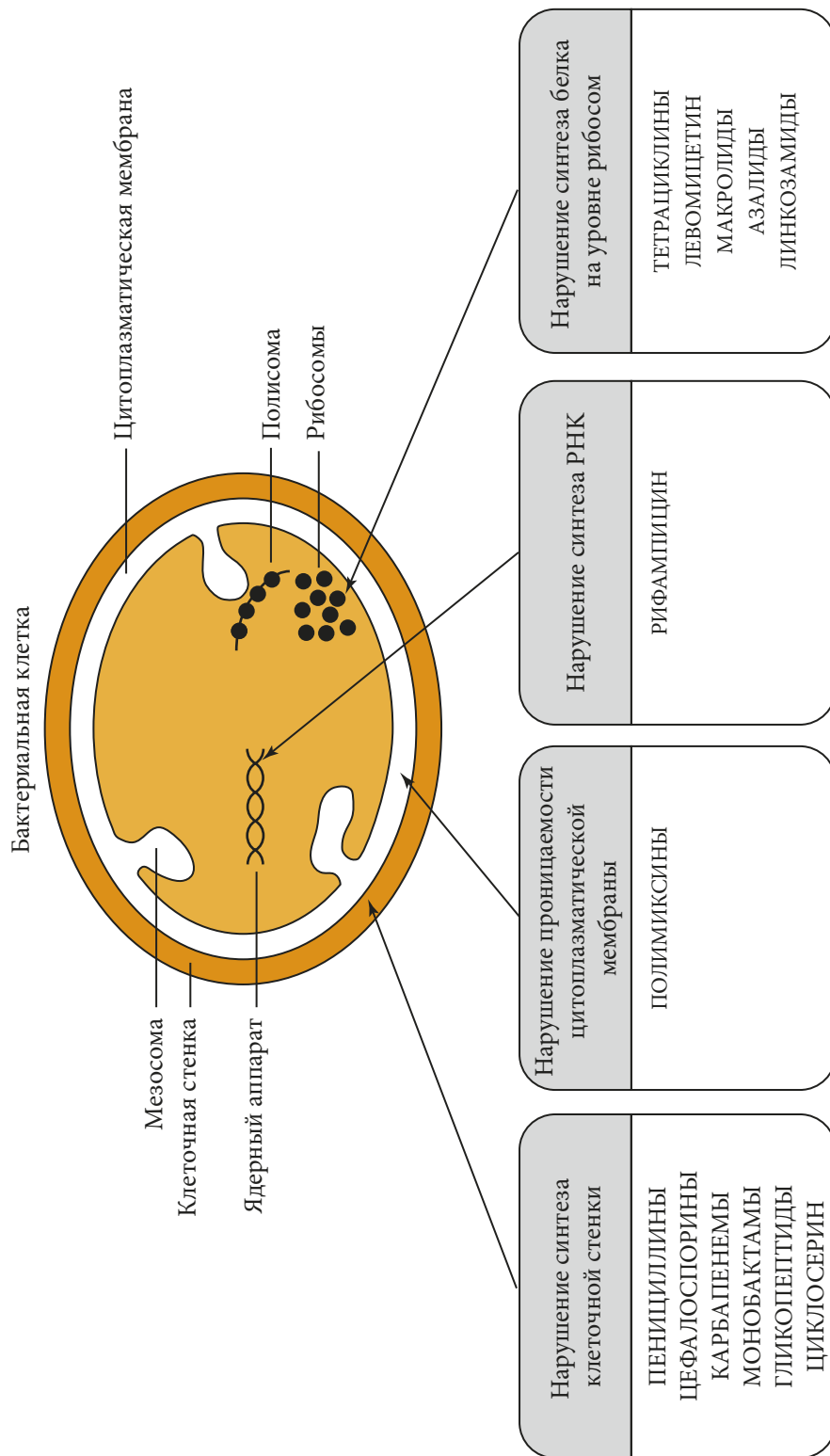


Рис. 1. Механизмы действия антибактериальных антибиотиков

4.2. Резистентность микроорганизмов к антибиотикам

Часто при действии антибиотиков на чувствительные к ним микроорганизмы возникают устойчивые к их действию формы. Так, адаптация быстро формируется под действием пенициллина и стрептомицина. В настоящее время антибиотики нашли широкое применение в различных областях деятельности человека, поэтому возникновение устойчивых форм микроорганизмов имеет очень важное значение.

Наблюдается закономерность — чем активнее антибиотики применяются для лечения инфекционных заболеваний, тем больше устойчивых к ним форм бактерий возникает. Причем резистентные бактерии обнаруживаются не только при использовании антибиотиков в клиниках, но и в природных естественных условиях, например, в ряде регионов в грунтовых водах найдены устойчивые к антибиотикам формы кишечной палочки. Таким образом, практическое значение проблемы адаптации микроорганизмов к действию антибиотиков связано с тем, что появление резистентных форм может привести к снижению эффективности лечебных свойств антибиотиков. Поэтому при выборе препарата и применении антибиотиков для лечения в клинике следует учитывать его эффективность в отношении возбудителя заболевания и индивидуальные особенности больного.

Для экспериментальной проверки эффективности препарата используют бумажные диски, пропитанные растворами антибиотиков. Диски помещают на питательную агаровую пластинку, засеянную конкретными выделенными возбудителями заболевания, выявляют чувствительность микроорганизма к антибиотику и именно его назначают больному. Испытания следует проводить при соблюдении стандартных условий (состав питательной среды, концентрация исследуемого антибиотика).

5. ЗНАЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ

Большое теоретическое и прикладное значение имеет изучение влияния антибиотиков на жизнедеятельность микроорганизмов, их продуцирующих. Выяснение взаимодействия продуцента и образуемого им антибиотика поможет выявить особенности биосинтеза антибиотиков и установить механизм их действия.

Биосинтез антибиотиков микроорганизмами имеет приспособительное значение, а также является наследственно закрепленной особенностью микроорганизмов и регулируется особыми генами. Установлено, что антибиотики влияют на метаболизм организмов-продуцентов путем активации или ингибирования ферментных систем, выполняющих регуляторные функции.

Известно, что такие антибиотики, как пенициллины, стрептомицин, тетрациклины, выделяются в основном в среду, которая окружает микроорганизм, в то время как другие — кандицидин, ристомин — частично выделяются в среду, а большая часть остается в клетках продуцента. Третья же группа антибиотиков — грамицидины, эндомицин, римоцидин — в окружающую среду практически не выделяются и остаются связанными с клетками организмов-продуцентов. Таким образом, можно утверждать, что роль антибиотиков в жизнедеятельности микроорганизмов неодинакова. В процессе эволюции микроорганизмы приспособились к действию антибиотиков в тех концентрациях, в которых они вырабатываются, в то время как при увеличении концентрации угнетается развитие и прекращается рост продуцентов, например, стрептомицетов, т. е. организмы-продуценты проявляют устойчивость к производимым ими антибиотикам. Так, чувствительность штаммов *S. griseus* к стрептомицину зависит от продуктивности продуцента — высокопродуктивные микроорганизмы проявляют высокую устойчивость к антибиотику, а менее активные штаммы при тех же концентрациях в среде антибиотического вещества расти не будут, штаммы, не образующие стрептомицин, совсем не развиваются. Это свойство стрептомицетов используется при селекции высокопродуктивных штаммов *S. griseus*, при добавлении в среду стрептомицина в определенной концентрации лучше развиваются наиболее активные штаммы стрептомицета.

5.1. Механизмы защиты микроорганизмов от вырабатываемых ими антибиотиков

Микроорганизмы, продуцирующие антибиотики, выработали механизмы для обеспечения своей защиты от этих биологически активных соединений. Следует отметить, что «дикие» штаммы, выделенные из природных источников, обладают невысокой биосинтетической продуктивностью и проявляют резистентность к вырабатываемому антибиотику на уровне клеточных мембран. Высокопродуктивные микроорганизмы защищаются от вырабатываемых ими антибиотиков, во-первых, путем их ферментативной инактивации. Этот механизм есть у организмов-продуцентов аминогликозидов, полимиксинов, макролидов, грамицидина С, хлорамфеникола.

Во-вторых, за счет образования метаболитов, инактивирующих антибиотики. Например, выработка цистеина приводит к инактивации пенициллина, стрептомицина, глитоксина.

В-третьих, продуценты выводят из клеток продуцируемый ими антибиотик и препятствуют его обратному проникновению внутрь клетки. Даже если часть антибиотика сможет проникнуть в клетку, он там обезвредится за счет фосфорилирования, например, такой процесс обнаружен у продуцента неомицина.

В-четвертых, у некоторых микроорганизмов вырабатываемый антибиотик скапливается в цистернах (специальные клеточные образования), а затем выводится из клетки.

Этот путь характерен для организмов-продуцентов хлортетрациклина, виомицина, эритромицина, пенициллина.

В-пятых, резистентность к продуцируемому антибиотику связана с изменением мишени или модификации молекулы антибиотического вещества. Эти механизмы выявлены у стрептомицетов, продуцирующих макролиды, актиномицины и другие антибиотики.

В-шестых, устойчивость к антибиотику обусловлена наличием у него генов устойчивости, например, продуцентов актиномицинов, аминогликозидов, актиномицинов, макролидов.

В-седьмых, устойчивость стрептомицетов, вырабатывающих актиномицины, проявляется в результате изменения транскрипции под действием антибиотика и за счет производства в клетках организма-продуцента актиномицинсвязывающих белков.

5.2. Роль антибиотиков в жизнедеятельности собственных продуцентов

В процессе эволюции организмы-продуценты антибиотиков выработали механизмы защиты от вырабатываемых ими антибиотиков, в то же время антибиотики могут оказывать воздействие на метаболизм собственного продуцента. Рассмотрим это на примере некоторых антибиотиков:

1. *Тетрациклины*. Установлено, что хлортетрациклин подавляет анаэробное и аэробное дыхание *S. aureofaciens*. Синтез антибиотика этим продуцентом обратно пропорционален активности ферментов цикла Кребса (цикла трикарбоновых кислот — ЦТК). Снижение активности ферментов связано с расходом кофермента А (КоА) для синтеза углеродной цепи молекулы хлортетрациклина. Так, активность ферментов цикла Кребса в 2–3 раза ниже у тех штаммов *S. aureofaciens*, которые производят антибиотик, по сравнению со штаммами, не производящими его. При добавлении тетрациклина в питательную среду продуктивность организма-продуцента снижается, но при этом не оказывается влияние на рост и развитие стрептомицета. Окситетрациклин влияет на углеводный обмен *S. rimosus*, подавляя потребление мальтозы и пирувата первым поколением клеток, мицелий этой генерации не синтезирует данный антибиотик. Повышение концентрации окситетрациклина ведет к усилению подавляющего эффекта, особенно это проявляется у штамма, не продуцирующего окситетрациклин. Этот антибиотик способен подавлять окислительное фосфорилирование в первом поколении клеток микроорганизма, образующих и не образующих окситетрациклин, в то время как в последующем поколении — только у варианта, не продуцирующего антибиотик.

2. *Хлорамфеникол*. При добавлении хлорамфеникола в среду, в которой развивается *S. venezuelae*, происходит торможение биосинтеза антибиотика, но не оказывается влияние на развитие стрептомицета. Это можно объяснить тем, что хлорамфеникол блокирует определенные ферментативные системы микроорганизма, участвующие в биосинтезе антибиотика, но не влияет на рост стрептомицета. Установлено, что добавление хлорамфеникола в концентрации 100 мкг/мл в среду перед началом ее засева организмом-продуцентом способствует удлинению лаг-фазы микроорганизма пропорционально количеству добавляемого хлорамфеникола.

3. *Нистатин*. В процессе развития стрептомицета нистатин содержится главным образом в мицелии, поскольку клеточные стенки *Streptomyces noursei* с трудом пропускают антибиотик. Нистатин полностью подавляет синтез антибиотка, если его вносить в среду перед началом развития микроорганизма в концентрации 8 000 ед./мл, в то же время образование биомассы организма-продуцента угнетается незначительно — только на 10–20 %, в то время как

в меньшей концентрации — 4000 ед./мл — значительного влияния на биосинтез антибиотика не проявляется. Установлено, что активность 6-фосфатдегидрогеназы (фермент пентозного цикла расщепления углеводов) в начале роста активного штамма *S. noursei* в 4 раза ниже, чем у неактивного штамма. Следует отметить, что активность фермента резко падает именно в тот период, когда микроорганизм начинает продуцировать антибиотик. Таким образом, нистатин оказывает регулирующее воздействие на глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу. При этом ферменты пентозного цикла углеводного обмена более чувствительны к действию антибиотика, чем ферменты гликолиза и цикла Кребса. Этот факт позволяет утверждать, что нистатин направляет обмен веществ организма-продуцента по пути Эмбдена — Мейергофа — Парнаса (ЭМП), что способствует большему накоплению энергии для биосинтетических процессов.

4. **Грамицидин С.** При развитии организма-продуцента *B. bacillus* внутриклеточно синтезируется грамицидин С, способный влиять на спорообразование и биосинтез антибиотика микроорганизмом. Например, при добавлении грамицидина С в питательную среду стимулируется биосинтез этого антибиотика культурой *B. bacillus P⁺*, кроме того, в концентрации 100 мкг/мл он блокирует действие ингибитора биосинтеза грамицидина С (β -фенил- β -аланин) и продуцент вновь начинает синтезировать этот антибиотик. Экспериментально установлено, что количество антибиотика в культуральной жидкости резко уменьшается в процессе образования спор. При спорообразовании в споры переходит до 50 % грамицидина, содержащегося в вегетативных клетках бактерий. Следует отметить, что клетки и прорастающие споры микроорганизма *B. bacillus* образуют фермент грамицидиназу, способный инактивировать грамицидин С. Так, более 45 % его разрушается в течение 24 ч при 37 °С. Грамицидиназа проявляет действие по типу химитрипсин-протеиназы и разрушает пептидные связи, образованные карбоксильными группами фенилаланина и лейцина. Следовательно, снижение количества антибиотика в спорах в процессе их прорастания связано с действием грамицидиназы, образующейся в прорастающих спорах. Одновременно с этим антибиотик связывается фосфолипидами примерно на 47–49 %. Таким образом, процессы ферментативной инактивации и связывания грамицидина С фосфолипидами служат приспособлением микроорганизма к ингибирующему действию антибиотика на прорастание спор. Подводя итог, можно сказать, что грамицидин С, внесенный в среду, усиливает биосинтез антибиотика, а также в зависимости от его концентрации и стадии развития продуцента он способен тормозить или ускорять процесс спорообразования.

6. АНТИБИОТИКИ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ

Известно, что химическая структура молекулы антибиотика определяется индивидуальными особенностями метаболизма организма-продуцента. В свою очередь, строение образуемых соединений обуславливает биологическое действие антибиотиков. Таким образом, представляет интерес рассмотрение отдельных групп антибиотиков, сходных по строению их молекулы, механизму действия и спектру биологической активности, а также методов их получения и применения в медицине.

Первый антибиотик, открытый А. Флемингом, пенициллин, принадлежит к β -лактамным антибиотикам. В настоящее время β -лактамы являются самой многочисленной группой антибиотиков и представлены пятью большими семействами, которые объединены наряду с общим химическим строением (наличием β -лактамного кольца) общим механизмом действия. Кроме того, для них характерен общий механизм резистентности устойчивых к антибиотику штаммов микроорганизмов, способных синтезировать ферменты β -лактамазы, разрушающие молекулы этих антибиотиков.

В группу β -лактамных антибиотиков входят:

- 1) пенициллины;
- 2) цефалоспорины и цефамицины;
- 3) карбапенемы и пенемы;
- 4) моноциклические β -лактамы.

6.1. Пенициллины

Пенициллины — группа антибиотиков, продуцируемых многими видами плесеней рода *Penicillium*, активных в отношении большинства грамположительных, а также некоторых грамотрицательных микроорганизмов. Как уже говорилось ранее, пенициллин, открытый А. Флемингом, был исторически первым антибиотиком. С него началось производство антибиотиков и применение их в медицине.

6.1.1. Природные пенициллины

Одновременно с организацией промышленного производства пенициллина началось подробное его изучение. Оно шло в следующих направлениях:

1. Селекция наиболее продуктивных штаммов плесневого гриба, образующих большое количество пенициллина и пригодных для массового производства.
2. Изучение физиологии образования пенициллина грибом с целью создания наиболее благоприятных условий для накопления этого вещества.
3. Исследование химической природы пенициллина.
4. Экспериментальное и клиническое изучение лечебных свойств пенициллина.

Над вопросом изучения химической природы пенициллина работали несколько десятков групп исследователей в Англии и США в годы Второй мировой войны. Это оказалось одной из труднейших задач, когда-либо встававших перед химиками. Трудность объяснялась несколькими причинами:

1. Молекула пенициллина обладает своеобразным строением, и в то время не было известно аналогий среди других органических соединений. Это обстоятельство потребовало углубленного изучения не только самого пенициллина, но и тех ранее недостаточно изученных типов органических соединений, к которым он принадлежал или в которые он превращался в результате химического воздействия.

2. Пенициллиновая молекула обладает большой лабильностью, способностью легко изомеризоваться и расщепляться.

3. Выделенный и исследуемый пенициллин не был индивидуальным веществом.

Работа, интенсивно проводившаяся несколькими сотнями химиков и физиков в 1942–1945 гг., была успешно закончена в 1945 г. В результате установлено, что выделяемые концентраты содержат не один, а несколько различных пенициллинов, имеющих общую формулу (схема 1):

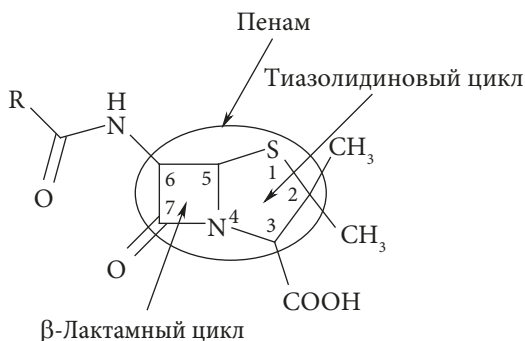


Схема 1. Общая формула пенициллинов

Таким образом, пенициллины — это монокарбоновые кислоты с гетероциклическим скелетом, которым является пенам, состоящий из конденсированных тиазолидинового и β -лактамного колец. При С(2) находятся две метильные группы; в С(6) положении — ацилированная аминогруппа. Различные пенициллины отличаются природой ацильного остатка R.

Рентгеноструктурный анализ позволил выявить особенности пространственного строения пенициллинов (схема 2).

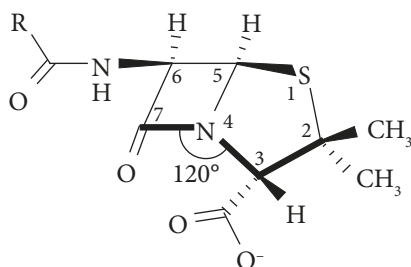


Схема 2. Пространственное строение пенициллинов

В ионе бензилпенициллина ($R = \text{CH}_2\text{Ph}$) тиазолидиновое кольцо не является строго плоскостным. С(3) атом лежит вне плоскости других атомов цикла. Карбонильный атом кислорода β -лактамного кольца не находится в одной плоскости с этим кольцом — он несколько отклонен в направлении к тиазолидинового цикла. Угол между плоскостями тиазолидинового и β -лактамного колец составляет примерно 120° . Карбоксильная группа и β -лактамное кольцо находятся в *транс*-положении по отношению к плоскости тиазолидинового кольца, тогда как фенилацетамидная группировка (PhCH_2CONH) и тиазолидиновое кольцо лежат по одну сторону β -лактамного цикла (*цис*-расположение).

В настоящее время известно 7 природных пенициллинов, отличающихся ацильным радикалом R, у которых полностью установлено строение (табл. 1) и 10 пенициллинов с неустановленным строением.

Таблица 1

Некоторые природные пенициллины

R	Химическое название	Условное название	
		Английское	Американское
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2-$	н. Амилпенициллин	Гигантеновая кислота	Дигидропенициллин F
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$	2-Пентенилпенициллин	Пенициллин I	Пенициллин F
PhCH_2-	Бензилпенициллин	Пенициллин II	Пенициллин G

R	Химическое название	Условное название	
		Английское	Американское
$4\text{-HOOC}_6\text{H}_4\text{-}$	<i>n</i> -Оксибензилпенициллин	Пенициллин III	Пенициллин X
$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_5\text{-CH}_2\text{-}$	н. Гептилпенициллин	Пенициллин IV	Пенициллин K
$\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	3-Пентенилпенициллин	Флавацидин	Флавацидин
$\text{HOOC-CH(NH}_2\text{)-(CH}_2)_3\text{-}$	4-Амино-4-карбокси-бутилпенициллин	Пенициллин N	Синнематин В

Антибактериальное действие каждого вида пенициллина сейчас хорошо изучено. Оказалось, что, несмотря на большое сходство физических и химических свойств, природа радикала существенно влияет на антибактериальную активность. Наиболее активны пенициллины G и K. Однако пенициллин K чрезвычайно неустойчив, и в производстве получают пенициллин G — бензилпенициллин.

Пенициллин G — сильная кислота, константа диссоциации $\text{pK}_a = 2,7$. Благодаря этому, он способен давать соли со щелочными и щелочноземельными металлами, а также с органическими основаниями.

В свободном виде (в виде кислоты) плохо растворим в воде, но хорошо растворим в таких растворителях, как низшие спирты, кетоны (в том числе циклические), сложные эфиры (бутилацетат, амилацетат, диметилфталат). Однако растворимость в значительной степени зависит от pH среды. Так, при экстракции бензилпенициллина из водного раствора бутилацетатом коэффициент распределения (табл. 2) между бутилацетатом (растворителем, используемым в промышленности для экстракции этого антибиотика) и водой возрастает при уменьшении pH среды.

Таблица 2

Зависимость K_p пенициллина в бутилацетате от pH раствора (при 0 °C)

pH	4	2,5	0
K_p	1,8	35	50–60

В производстве экстракцию проводят при $\text{pH} = 1,9\text{--}2,2$.

В ароматических и жирных углеводородах пенициллин в виде кислоты почти нерастворим. Из хлорированных углеводородов лучшим растворителем является хлороформ ($\text{K}_p = 14$ при $\text{pH} 2,5$, $t = 0^\circ\text{C}$), тогда как в этих же условиях в дихлорэтано $\text{K}_p = 8,6$, в четыреххлористом углероде $\text{K}_p = 1$.

Соли пенициллина, наоборот, прекрасно растворимы в воде.

Особенности химического строения молекулы пенициллинов

Химические особенности пенициллинов в значительной мере обусловлены наличием в их молекуле бициклической системы, построенной из конденсированных тиазолидинового и β -лактамного кольца, влияние которых друг на друга проявляется в очень сильной степени. Это влияние приводит к тому, что гетероциклическая система характеризуется специфическими особенностями, резко отличающимися от свойств каждого из циклов в отдельности. Тиазолидиновый цикл в этой системе обладает значительной устойчивостью, в то время как лактамное кольцо легко разрушается по связи между атомом N и атомом C карбонильной группы уже на первых этапах большинства превращений пенициллинов. Амидная связь лактамного кольца пенициллинов несравненно менее устойчива, чем у моноциклических β -лактамов, и еще в меньшей степени, чем у обычных амидов. Так, обычные амиды (схема 3, а) — устойчивые соединения, лишь с трудом поддающиеся гидролизу вследствие распределения электронной плотности между атомами O—C—N. В молекулах моноциклических β -лактамов (схема 3, б) такое распределение электронной плотности затруднено, потому что оно должно приводить к значительному напряжению четырехчленного кольца. Что касается β -лактамного кольца, входящего в состав бициклической системы (схема 3, в), содержащейся в молекуле пенициллинов, то в этом случае подобное распределение электронной плотности практически исключено вследствие некомпланарности данной системы.

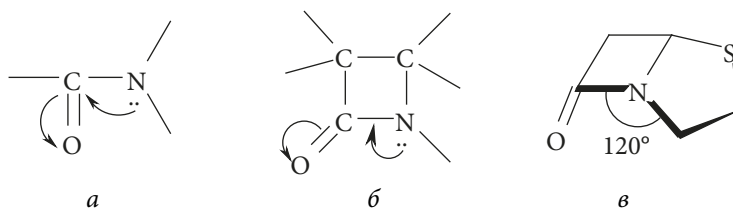


Схема 3. Различные виды амидных связей:
а — линейная амидная связь; б — моноциклическая амидная связь;
в — амидная связь в бициклической структуре

Как было установлено еще в 40-е гг. XX в., именно β -лактамное кольцо играет определяющую роль в биологической активности пенициллинов, и его расщепление ведет к полной утрате активности.

Таким образом, потеря активности является следствием лабильности молекулы пенициллина, в свою очередь, связанной с наличием в ней четырехчленного кольца.

В виде свободной кислоты пенициллин G нестойк как в твердом кристаллическом состоянии, так и в растворах — в воде и низших алифатических спиртах. Инактивация происходит очень быстро. В безводных органических растворите-

лях (хлороформе, бутилацетате) он более стоек, сохраняет активность в течение суток при 0 °С. Во всех случаях в присутствии воды скорость инактивации растет. Она увеличивается также в присутствии различных примесей.

Большое значение для инактивации пенициллина имеет рН среды. Для сохранения активности (устойчивости) пенициллина G наиболее благоприятным является рН = 6–7 (инактивация на 50 % за 5,0–5,5 ч).

Скорость инактивации других природных пенициллинов зависит от ацильного остатка в лактамном кольце; наименее устойчив пенициллин К (рис. 2).

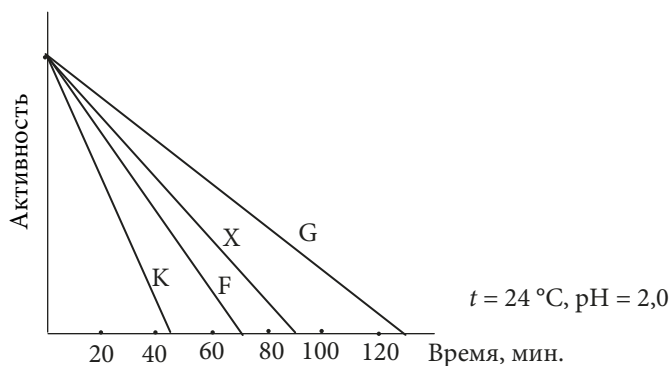


Рис. 2. График зависимости активности водных растворов пенициллинов от времени

Соли пенициллина более устойчивы. Так, в сухом состоянии они могут храниться 6 месяцев при комнатной температуре без потери активности; при 100 °С активность снижается на 20 % в течение 10 недель; нагрев в вакууме при 153 °С в течение 25 ч и даже нагрев до 170 °С на воздухе в течение 1 ч не приводят к потере активности.

Методы установления строения пенициллинов

1. Изучение продуктов гидролитического распада.

Конечными продуктами гидролиза пенициллина являются пеницилламин и пениллоальдегид (в кислой среде), а также пенициллоиновая кислота (в щелочной среде; схема 4).

Все продукты распада не активны.

2. Получение дестиопенициллина.

Наибольшие возражения вызывало четырехчленное β -лактамное кольцо, которое до этого ни разу не было обнаружено в природных соединениях. Специально проведенными опытами мягкого каталитического гидрирования и гидрогенолиза пенициллина удалось расщепить только тиазолидиновое кольцо, оставив нетронутым β -лактамное. Был получен дестиопенициллин, в котором сохранено это β -лактамное кольцо (схема 5).

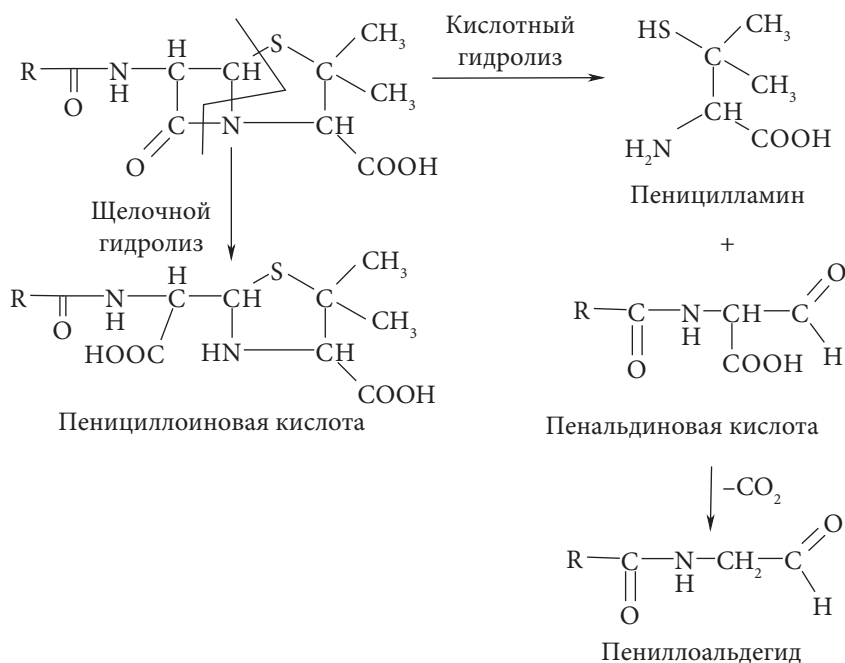


Схема 4. Гидролитический распад пенициллина

3. Применение рентгеноструктурного и кристаллографического анализа.

4. Строение было подтверждено синтезом.

Синтез проводился двумя путями (в 1946 и 1951 гг.), но оба дали низкий выход, около 0,1 %.

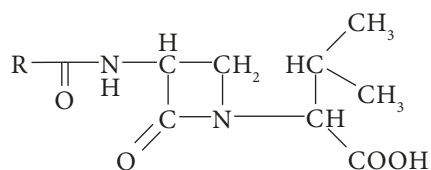


Схема 5. Структура дестиопенициллина

Механизм действия природных пенициллинов

Пенициллины являются антибиотиками, оказывающими бактерицидное действие на микроорганизмы вследствие нарушения ими синтеза клеточной стенки бактерий (пептидогликана муреина).

Синтез клеточной стенки бактерий — многоэтапный процесс. В цитоплазме из *N*-ацетилглюкозамина и молочной кислоты синтезируется *N*-мурамовая кислота, к которой поэтапно присоединяются 5 аминокислот: *L*-Ала, *D*-Глу, *L*-Лиз или мезо-АП и две молекулы *D*-Ала.

В цитоплазматической мембране к *N*-ацетилмурамовой кислоте присоединяется *N*-ацетилглюкозамин с образованием длинной полисахаридной цепочки, а к *L*-лизину пентапептида присоединяется 5 молекул глицина (у грамположительных бактерий).

С наружной стороны мембраны с помощью фермента карбоксипептидазы происходит отщепление конечной молекулы *D*-аланина, а фермент транс-пептидаза «сшивает» пептидные мостики, образуя гигантскую мешковидную структуру — пептидогликан муреин (рис. 3).

В синтезе клеточной стенки бактерий принимает участие большое количество ферментов, но наибольшее значение имеют карбоксипептидазы и транс-пептидазы. Эти ферменты проявляют сродство к пенициллинам. β -Лактамное кольцо пенициллина и других антибиотиков подобной структуры оказалось комплементарным структуре активного центра этих ферментов. И поскольку эти ферменты проявили сродство к β -лактамным антибиотикам, их назвали пенициллинсвязывающими белками (ПСБ).

В процессе связывания пенициллина с ферментом карбонильный углерод β -лактама нуклеофильно атакуется группами активного центра ПСБ ($-\text{OH}$), и β -лактамное кольцо раскрывается (схема б).

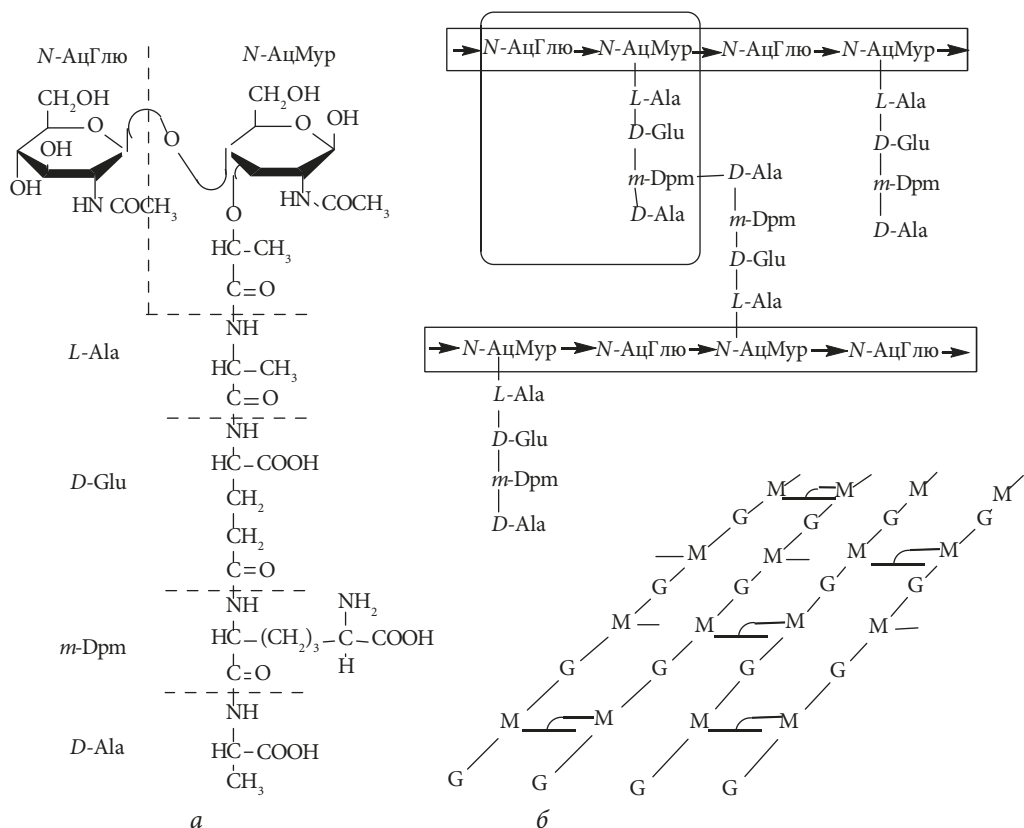


Рис. 3. Структура муреина *Escherichia coli*:

a — детальное строение фрагмента, изображенного *справа* в рамке; *б* — схематическое перспективное изображение структуры однослойного поперечносшитого муреинового мешка, состоящего из *N*-АцГлю (G) и *N*-АцМур (M), *m*-Dpm — мезо-диаминопимелиновая кислота

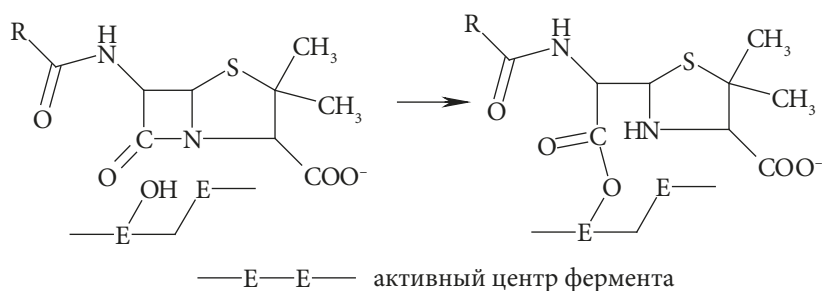


Схема 6. Расщепление β -лактамного кольца под действием фермента

Связывание ферментов с β -лактамами антибиотиками является необратимым. Ферменты, ацилированные β -лактамами антибиотиками, теряют нативную структуру и не могут выполнять свои функции — отщеплять молекулу D-аланина от пентапептида и «сшивать» полисахаридные цепи в процессе роста прокариотной клетки, т. е. прекращается синтез клеточной стенки, и клетка погибает не от пенициллина или другого β -лактамого антибиотика, а от осмотического шока (без клеточной стенки клетка засасывает воду и разрушается).

Таким образом, для проявления антибактериальной активности β -лактамов антибиотиков необходима комплементарность его β -лактамного кольца активному центру фермента, при этом эндоциклическая амидная связь в β -лактаме должна быть достаточно лабильной для разрыва в процессе связывания.

К числу количественных характеристик, хорошо коррелирующих с биологическими свойствами, относится константа скорости основного гидролиза β -лактамого антибиотика при pH 9,6–10,0. Этот процесс моделирует нуклеофильную атаку β -лактамого карбонила в биологической среде. Чем выше скорость гидролиза, тем больше антибактериальная активность соответствующего соединения. Так, для активных соединений период полураспада в реакции основного гидролиза составляет 3–20 ч, а для неактивных — более 70 ч. Расчеты показывают, что период полураспада β -лактамого кольца цефалоспоринов IV поколения составляет 1–10 ч.

Таким образом, β -лактамы антибиотиков с различными вариантами ядер обладают активностью, пока амидная связь β -лактама имеет высокую реакционную активность, т. е. способность ацилировать фермент, и зависит она от строения радикала R в ацильном остатке.

Механизм биосинтеза молекулы пенициллина

Для изучения этого вопроса использовали соединения, имеющие в своем составе меченые атомы C^{14} , N^{15} , S^{35} . Эти вещества вводили в питательную среду для культивирования, затем пенициллин извлекали, очищали и подвергали гидролизу, после чего в осколках молекулы определяли радиоактивность (схема 7).

В ходе исследования промежуточных продуктов биосинтеза пенициллина был выделен трипептид, состоящий из аминокладипиновой кислоты, цистеина и валина (схема 8).

Конденсация L-α-аминокладипиновой кислоты, L-цистеина и L-валина с одновременным обращением конфигурации последнего приводит к трипептиду, дальнейшее замыкание β-лактамного и тиазолидинового колец дает изопенициллин N, в результате гидролиза которого под действием пенициллинацилазы образуется 6-аминопенициллановая кислота.

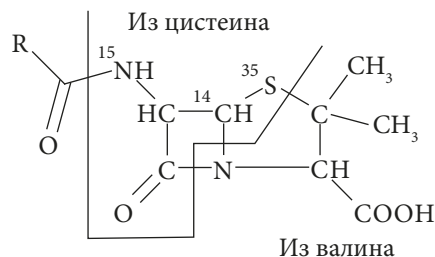


Схема 7. Расположение меченных атомов в структуре пенициллина

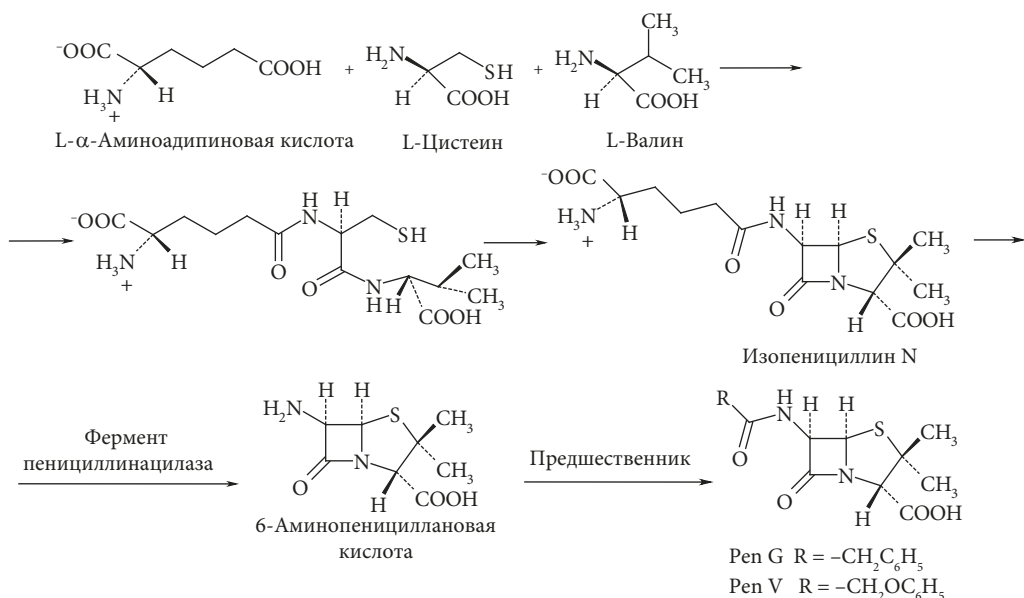


Схема 8. Механизм биосинтеза пенициллинов

Прямая ферментация последней в присутствии фенилуксусной кислоты приводит к образованию пенициллина G (Pen G, бензилпенициллина), а в присутствии феноксиуксусной кислоты образуется неприродный пенициллин V (Pen V, феноксиметилпенициллин).

Спектр антибактериального действия пенициллина

Пенициллины обладают широким спектром антибактериального действия, проявляя как бактериостатическую, так и бактерицидную активность в отно-

шении многих грамположительных микроорганизмов (стафилококков, пневмококков, стрептококков), некоторых грамотрицательных кокков (гонококков, менингококков), палочек сибирской язвы, клостридий, спирохет и некоторых актиномицетов. Широкое медицинское применение пенициллинов связано с их относительно низкой токсичностью для теплокровных животных. Мыши переносят дозы свыше 2 000 мг/кг массы через рот, 1 600 мг/кг — внутривенно и 500 мг/кг — внутривенно. Человеку можно вводить до 100 млн ЕД пенициллинов ежедневно, т. е. примерно 1 г/кг массы. Однако у некоторых людей эти антибиотики вызывают аллергические реакции и анафилактический шок.

Несмотря на большое сходство (отличаются только ацильные остатки), пенициллины резко отличаются по активности (табл. 3).

Таблица 3

Антибактериальная активность природных пенициллинов

Антибиотик	R	Активность, ЕД/мг
Пенициллин G	Бензил	1 657
Пенициллин K	<i>n</i> -Гептил	2 300
Пенициллин F	2-Пептенил	1 550
Пенициллин X	<i>n</i> -ОН-Бензил	900

Самый активный антибиотик — пенициллин K, но он и самый неустойчивый. Наиболее устойчив пенициллин G, потому он широко вошел в лечебную практику. Пенициллин G применялся при лечении крупозной и очаговой пневмонии, септическом эндокардите, раневых инфекциях, гнойных инфекциях кожи, мягких тканей, слизистых оболочек, разных формах ангины, рожистом воспалении, менингитах, скарлатине и гонорее. При лечении менингита и сепсиса он показал большую активность, чем сульфаниламиды.

Положительным свойством пенициллина G является большая избирательность его действия (высокий терапевтический индекс $I = L/T$, где L — летальная доза, мг/кг, T — терапевтическая доза, мг/кг).

6.1.2. Неприродные пенициллины

Необходимость поиска новых антибиотиков, имеющих β -лактамную структуру, вызвана следующими причинами:

1. Возникновением резистентных штаммов микроорганизмов. (В настоящее время число штаммов грамположительных бактерий, устойчивых к действию пенициллина G, составляет около 80 %.) Причина — в выработке бактериями фермента пенициллазы (β -лактамазы), разрушающего β -лактамное кольцо с потерей активности.

2. Необходимость расширения спектра действия, прежде всего за счет увеличения устойчивости к β -лактамазам грамотрицательных бактерий.

3. Изменение фармакокинетических характеристик с целью уменьшения частоты введения (выводится из организма через 2–6 ч).

4. Создание кислотостойких производных, пригодных для применения *per os*.

5. Уменьшение аллергических реакций.

Пути получения неприродных пенициллинов

1. Микробиологический путь (получение биосинтетических пенициллинов).

2. Полусинтетический путь (получение полусинтетических пенициллинов).

3. Полный синтез (представляет только теоретический интерес).

Метод направленной ферментации с предшественником

Этот путь основан на том, что продуцент пенициллина — плесневый гриб — способен использовать некоторые соединения, добавленные в питательную среду, для построения неприродного ацильного остатка. Такие соединения, способные включаться в молекулу антибиотика, получили название *предшественники*. Поэтому этот микробиологический путь называется *направленной ферментацией с предшественниками*. Данный путь впервые был применен для избирательного получения пенициллина G. Предшественником в данном случае была фенилуксусная кислота PhCH_2COOH или ее амид в количестве 0,1 %. Если добавить *n*-оксифенилуксусную кислоту $4\text{-HOOC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{COOH}$, получится преимущественно пенициллин X, а если капроновую — $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$, то амилпенициллин (или дигидропенициллин F), добавление аминокaproновой кислоты приводит к получению пенициллина N.

Для неприродных пенициллинов известны как предшественники β -феноксиэтанол или феноксиуксусная кислота, дающие пенициллин V или *феноксиметилпенициллин* (пенициллин V; схема 9).

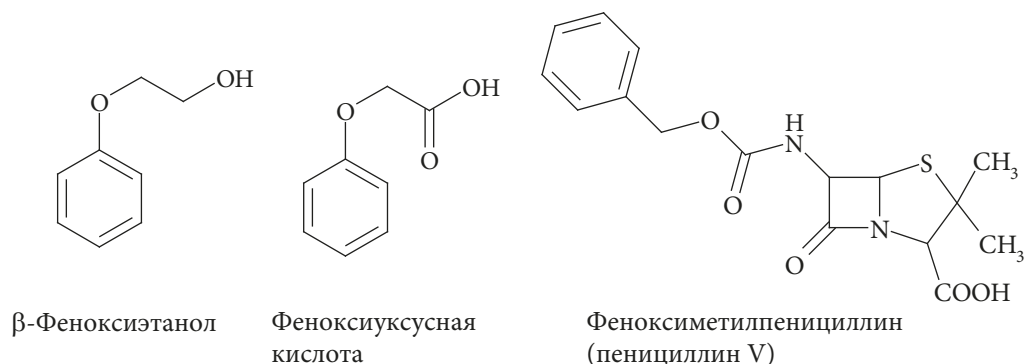


Схема 9. Строение феноксиметилпенициллина и предшественников при его получении — феноксиэтанола и феноксиуксусной кислоты

Пенициллин V вошел в медицинскую практику в 50-х гг. XX в. Этот пенициллин не инактивируется в кислой среде желудка, поэтому его можно применять *per os*.

Еще один пенициллин — *n*-аминобензилпенициллин (1948) значительно активнее в отношении кишечной палочки и других грамотрицательных бактерий, чем пенициллин G (схема 10).

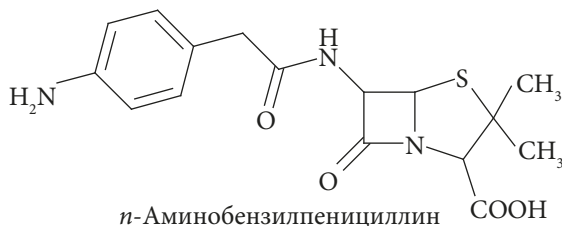


Схема 10. Строение *n*-аминобензилпенициллина

Этим путем можно получить еще ряд неприродных пенициллинов, отличающихся ацильными остатками. Но возможности метода ограничены, так как грибок может перерабатывать не любое вещество, а только некоторые производные фенилуксусной кислоты, феноксиуксусной кислоты, α , ω -дикарбоновых кислот.

Полусинтетические методы получения пенициллинов

Данные методы используют для синтеза всю или большую часть молекулы природного антибиотика, а не исходят из простых исходных соединений. Полусинтетические методы получения пенициллинов можно разделить на следующие группы:

1. Химические методы модификации молекулы природных пенициллинов.
2. Методы полусинтеза из 6-АПК:
 - а) модификация по 6-NH₂ группе;
 - б) одновременно с «а» модификация по COOH группе.

Химические методы модификации молекулы природных пенициллинов

Амилпенициллин может быть получен и путем полусинтеза — восстановлением 2-пентенил- или 3-пентенилпенициллинов (схема 11).

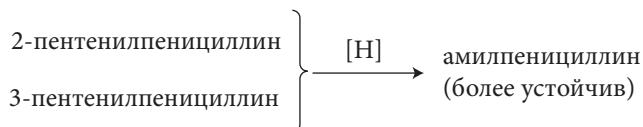


Схема 11. Получение амилпенициллина гидратацией 2-пентенил- или 3-пентенилпенициллинов

Таким образом, методом полусинтеза из одних природных антибиотиков может быть получен другой природный антибиотик. Но можно, используя функциональные группы молекулы природного или неприродного пенициллина, получить совершенно новый антибиотик. При этом нужно учитывать факт неустойчивости бициклической системы и проводить химические реакции в мягких условиях, обеспечивая целостность бициклической системы.

Так, при действии $KI + I_2$ в растворе $NaHCO_3$ было проведено йодирование пенициллина X с образованием моно- или дийодпроизводных (схема 12).

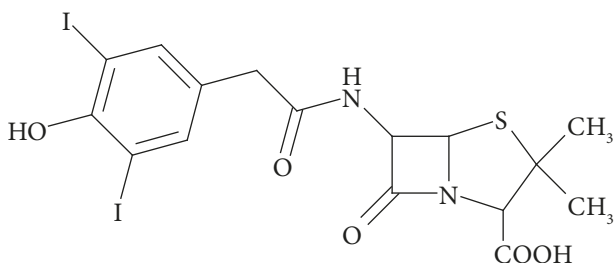


Схема 12. Дийодпроизводное пенициллина X

Дийодпроизводное пенициллина X по отношению к золотистому стафилококку превышает активность природного пенициллина X.

Второй реакцией, которую удалось провести, не затрагивая целостность скелета молекулы пенициллина, является реакция азосочетания *n*-оксибензилпенициллина с диазотированным *n*-Br-анилином и β -нафтиламином (схема 13).

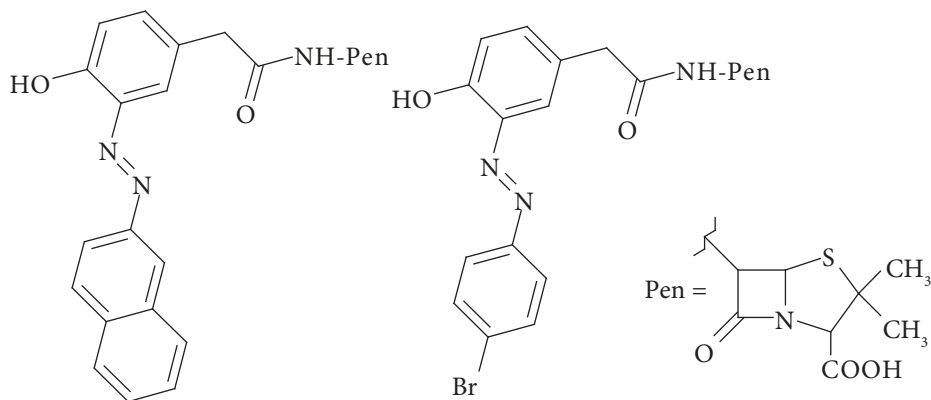


Схема 13. Пенициллины, полученные с помощью реакции азосочетания

Антибактериальная активность таких соединений превосходит антибактериальную активность природных пенициллинов, но сведений относительно их практического применения нет.

Дальнейшая модификация молекулы пенициллина проводилась также по карбоксильной группе и по сере тиазолидинового кольца.

Из этих соединений наибольший интерес представляют сложные эфиры пенициллина и гомопенициллины.

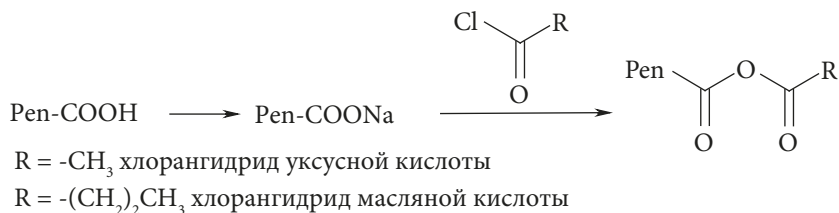


Схема 14. Синтез смешанного ангидрида пенициллина с другими карбоновыми кислотами

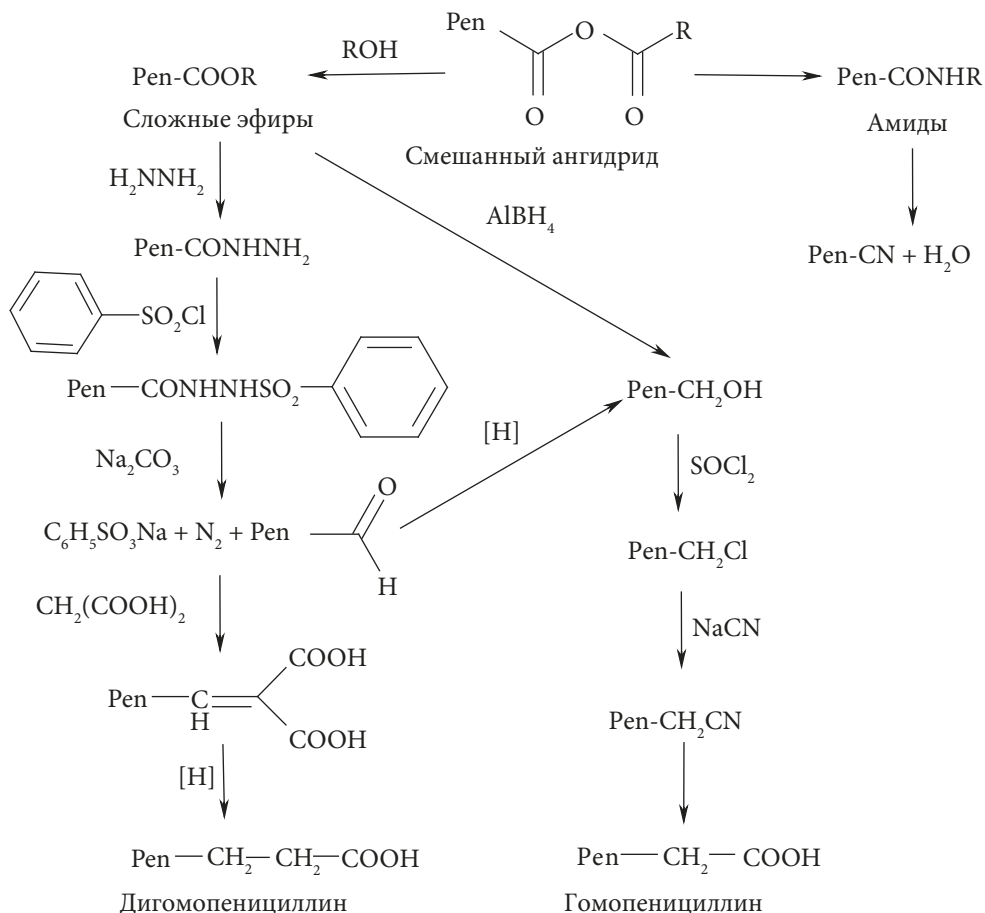


Схема 15. Модификации пенициллинов по COOH группе
через превращения смешанных ангидридов

Сложные эфиры пенициллина обладают способностью накапливаться в определенных органах или тканях организма. Так, практическое применение нашел эфир пенициллина G с *N*, *N*-диэтиламиноэтанолом в виде соли с HI:



In vitro препарат не активен, но *in vivo* он гидролизуеться, освобождая пенициллин. Эфициллин накапливается преимущественно в легочной ткани, поэтому он особенно успешно применялся при лечении пневмонии, бронхитов, плевритов и воспалительных процессов, сопровождающих рак легкого.

Гомопенициллины менее активны, но гомопенициллин V подавляет пенициллиноустойчивые грамотрицательные бактерии, дигомопенициллин V действует еще и на пенициллиноустойчивые грамположительные бактерии и стафилококки.

Также был использован кислотный характер пенициллина для образования солей с веществами основного характера. Полученные по COOH группе солевые лекарственные формы пенициллинов более устойчивы. Соли с минеральными основаниями лучше растворимы в воде, с органическими — хуже, но зато имеют пролонгированное действие.

1. *Na*- и *K*-соли пенициллина G применяют для инъекций.

2. Новокаиновая соль пенициллина G — мало растворима в воде, медленно всасывается, имеет пролонгированное действие, применяется внутримышечно в виде водной суспензии или с водным раствором экмолина (препарат экмоновоциллин; схема 16).

Бициллин-1 представляет собой *N*, *N*-дибензилэтилендиаминовую соль бензилпенициллина (схема 17).

Бициллин-1 практически не растворим в воде, вводится в виде водной суспензии пролонгированного действия, обнаруживается в организме от семи дней до нескольких недель.

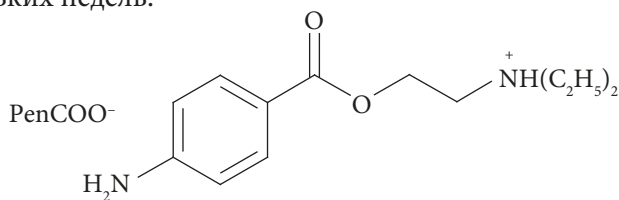


Схема 16. Новокаиновая соль пенициллина G

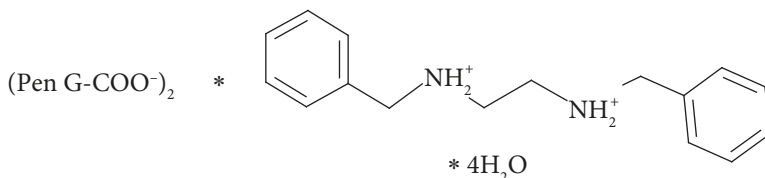


Схема 17. Строение бициллина-1

Бициллин-5 — смесь, содержащая одну часть новокаиновой соли бензилпенициллина и четыре части бициллина-1. Применяют для инъекций в виде суспензии в стерильной воде. Препарат пролонгированного действия, высокая концентрация сохраняется до четырех недель.

Окислением серы в тиазолидиновом цикле были получены два продукта: сульфон и сульфоксид (схема 18).

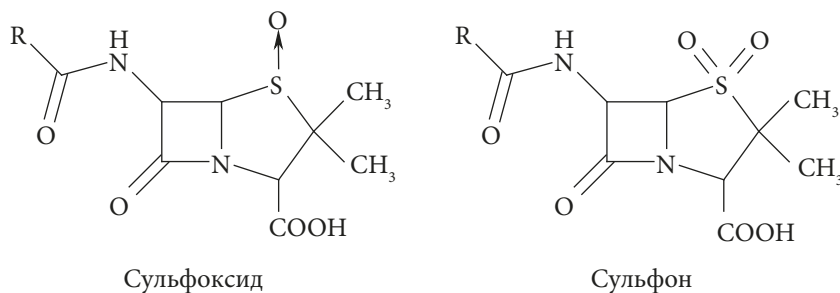


Схема 18. Строение сульфоксида и сульфона пенициллина

Получены сульфоксиды пенициллинов G и V. Они активны на пеницилиноустойчивые формы грамположительных и грамотрицательных бактерий. Уровень активности ниже, чем у исходных соединений. Сульфоны не активны, но обладают ингибирующим действием на β -лактамазы.

Получение пенициллинов ацилированием 6-АПК

В 1959 г. в Англии Батчелор с сотр. показал, что если продуцент пенициллина выращивать без предшественников, то микроорганизм продуцирует в основном не пенициллин, а 6-АПК, которая обладает только слабым (50 мкг/мл) антибактериальным действием (1/200 действия пенициллина G) на грамположительные бактерии и совсем не действует на грамотрицательные, но которую можно обычными методами органической химии проацилировать и, следовательно, получить из нее любой не природный пенициллин (схема 19). Это открытие по своей важности можно приравнять к открытию пенициллина.

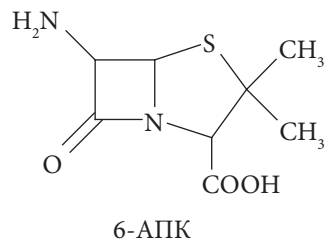


Схема 19. Строение 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК)

Способы получения 6-АПК

1. Биосинтез с помощью продуцентов пенициллина G со строго определенной дорогостоящей средой, но без предшественников. Характеризуется низким выходом на ферментации, сложной методикой экстрагирования из неочищен-

ного нативного раствора. Общие выходы на ферментации и экстракции были низкими, производственные расходы сравнительно высокими и, с коммерческой точки зрения, получение 6-АПК путем ферментации является невыгодным.

2. *Химический метод гидролиза пенициллина.* Для химического деацилирования боковой цепи пенициллина с целью получения 6-АПК требуется высокоспецифичный реагент, так как β -лактамная связь обладает высокой реакционной способностью и поэтому разрушается в первую очередь, в то время как экзоциклическая амидная связь значительно прочнее.

Были разработаны две схемы химического гидролиза. По первому методу (схема 20) при восстановительной циклизации *o*-нитрофеноксиметилпенициллина (I), получаемого ферментацией с соответствующими предшественниками под действием борогидрида в присутствии Pd/C, получают неустойчивые замещенные анилины (II), которые самопроизвольно гидролизуются в 6-АПК и соответствующий бензоксазин (III). Даже в оптимальных условиях выход 6-АПК не превышал 50 %. А главная трудность — получение *o*-нитрофеноксиметилпенициллина в больших количествах.

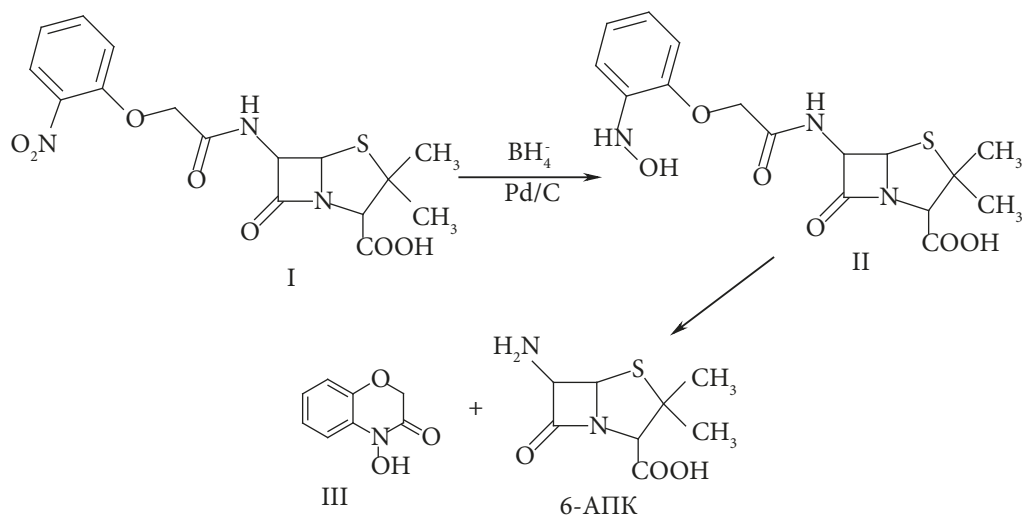


Схема 20. Получение 6-АПК гидролизом нитропроизводного феноксиметилпенициллина

В 1963 г. в Голландии был разработан химический способ получения иминоэфиров (IV) пенициллина, которые могут избирательно гидролизироваться до 6-АПК. Реакция включает предварительную защиту карбоксильной группы пенициллина диметилдихлорсиланом с образованием диметилсилилового эфира и последующее превращение экзоциклической амидной связи в иминоэфирную через иминохлорид (схема 21).

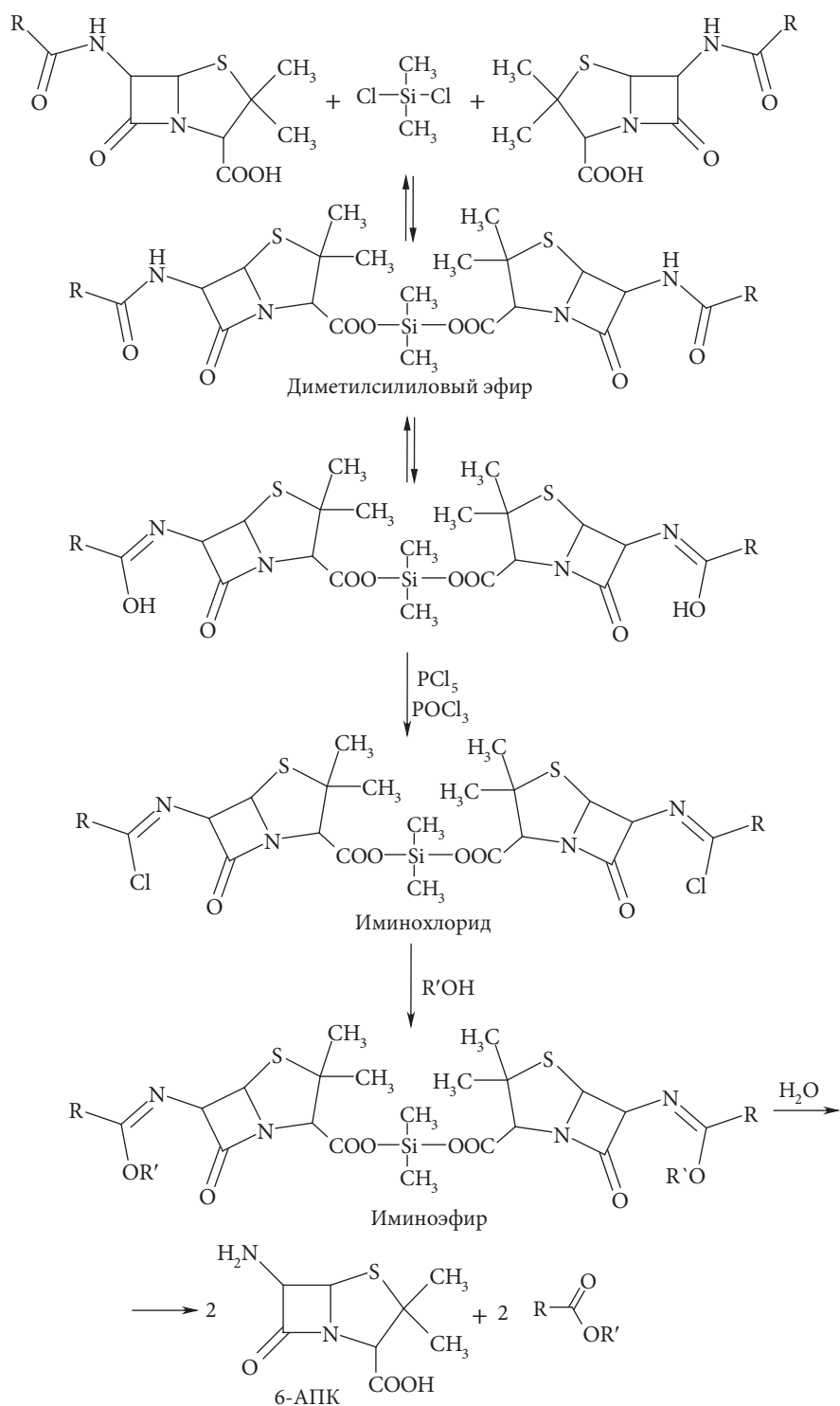


Схема 21. Метод получения 6-АПК химическим гидролизом иминоэфира

3. *Ферментативный гидролиз пенициллина*. Наиболее дешевым и технологически простым является ферментативный гидролиз пенициллинов, который позволяет осуществить процесс получения 6-АПК в водных растворах в одну стадию.

Он основан на способности некоторых микроорганизмов выделять экзофермент пенициллинамидазу (ПА) и расщеплять с его помощью пенициллины по связи $R-CO-NH-Pen$ с образованием 6-АПК и ацилирующей кислоты.

Здесь используется высокая специфичность действия ферментов, благодаря которой расщепляется именно эта пептидная связь, а не β -лактамная, являющаяся более лабильной (схема 22).

Было обнаружено два типа ферментов, катализирующих эту реакцию.

Один тип распространен среди актиномицетов и некоторых дрожжей. Он легко расщепляет природные пенициллины К, F, дигидропенициллин F, но в 100 раз медленнее пенициллин G. Из неприродных пенициллинов этот фермент легко расщепляет пенициллин V. Оптимальные условия ферментативного гидролиза: $t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $pH = 9,0$.

Второй тип ферментов обнаружен среди бактерий. Этот тип быстро расщепляет пенициллин G, но медленнее — пенициллин V. Чаще всего используют культуру *E. coli*. Оптимальные условия: $t = 20-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $pH = 7,3-7,5$.

Первоначально применяли не сами чистые ферменты, а бактериальные клетки, которые вносили в раствор очищенного пенициллина G. При этом процентное содержание пенициллина G не должно было превышать 3 %. При более высоких концентрациях пенициллина скорость гидролиза резко замедляется и в реакционной массе остается большое количество исходного пенициллина.

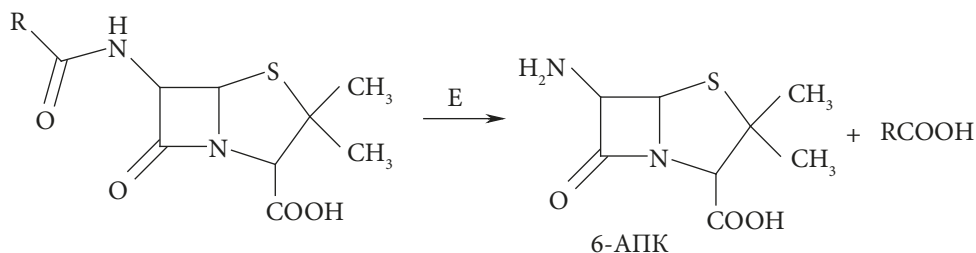


Схема 22. Образование 6-АПК из пенициллина ферментативным гидролизом

В процессе реакции приходится непрерывно нейтрализовать образующуюся кислоту водным раствором щелочи.

Выделение 6-АПК является сложным и трудоемким процессом:

1) экстракцией с переносчиком или переводением ее в основание Шиффа $Pen-N=CH-R$;

2) с помощью ионообменных смол (анионитов и катионитов) и элюации — аммиаком. Выход 80–90 %.

При этих методах выделения биокатализатор теряется безвозвратно.

Новым этапом в развитии методов ферментативного получения 6-АПК стало применение иммобилизованных ферментов, т. е. ферментов, фиксированных на органическом полимерном носителе (полиакриламидном геле). Наилучший ферментный препарат получается при использовании в качестве носителя пористого сополимера — этилакрилат/этиленгликольдиметилакрилат (диаметр пор 400 нм); 1 см³ этого носителя связывал 6,4 мг ПА, обладающей 72 % активности нативного фермента.

Оптимальные условия: для К-соли пенициллина G (6 % раствор) $t = 41 \pm 1$ °C, pH = 7,5–8,1.

Гетерогенный катализатор легко отделяется фильтрацией и многократно используется (до 700 раз). Получение 6-АПК с применением иммобилизованных ферментов значительно снизило стоимость 6-АПК и повысило ее выход.

4. *Синтетический путь* получения 6-АПК был разработан в США и имеет лишь теоретическое значение.

Способы ацилирования 6-АПК

Ацилирование 6-АПК может проводиться *хлорангидридами и ангидридами кислот* (схема 23).

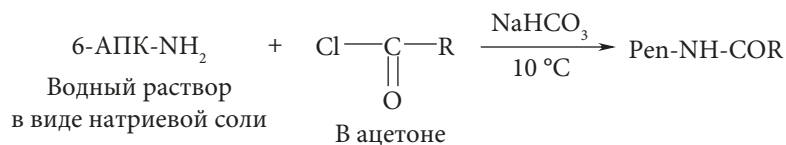


Схема 23. Хлорангидридный метод ацилирования 6-АПК

Так, к водному раствору 6-АПК, содержащему NaHCO₃, при охлаждении приливают раствор хлорангидрида кислоты в ацетоне. Избыток хлорангидрида экстрагируют растворителем (этилацетат). Выход при данном методе составляет 50–79 %. Он является общим методом ацилирования 6-АПК. Пенициллин выделяют из водного раствора.

При ацилировании 6-АПК *смешанными ангидридами* обычно используют ангидриды, полученные реакцией ацилирующей кислоты с эфиром хлоругольной кислоты (схема 24).

Избыток кислоты экстрагируют эфиром. Пенициллин выделяют из водного раствора. Выход колеблется в зависимости от вводимого ацила от 16 до 80 %.

Ацилирование 6-АПК может быть осуществлено также карбоновыми кислотами с использованием карбодиимидного метода. Так, например, активация ацилирующей кислоты может быть осуществлена дициклогексилкарбодиимидом (ДЦГКДИ; схема 25).

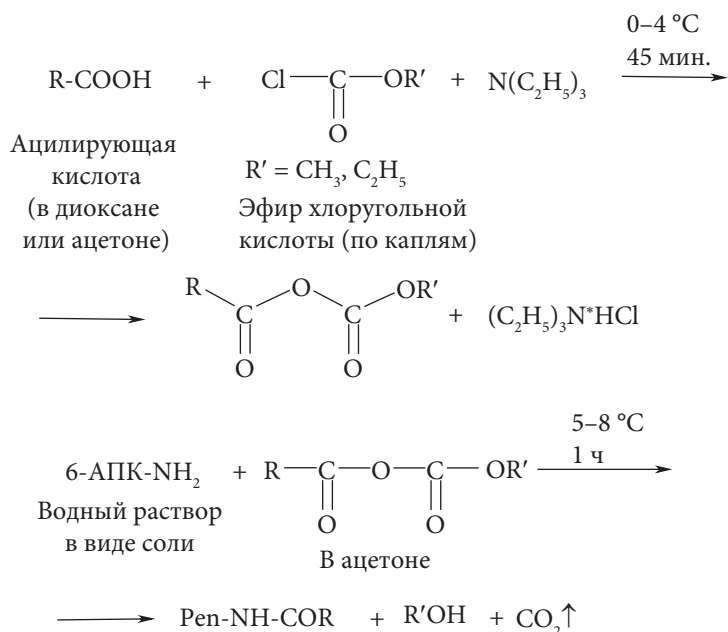


Схема 24. Получение смешанного ангидрида и ацилирование 6-АПК смешанным ангидридом

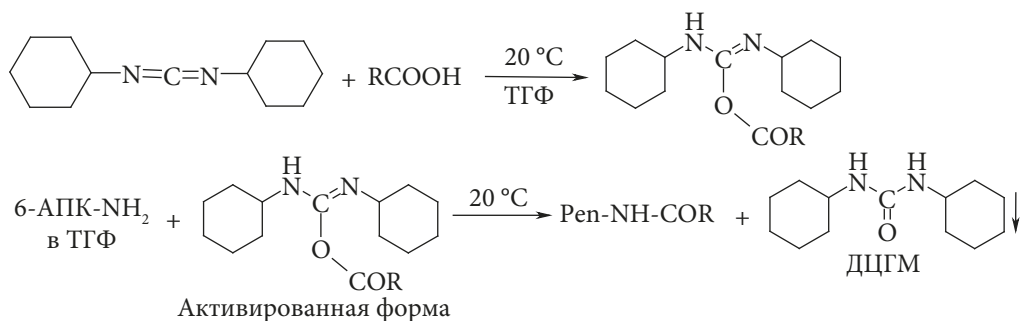


Схема 25. Ацилирование 6-АПК карбодиимидным способом

К раствору или суспензии кислоты в тетрагидрофуране (ТГФ) приливают раствор ДЦГКДИ в том же растворителе, а затем раствор 6-АПК в ТГФ, температура комнатная, растворители абсолютно сухие. Выделение пенициллина — фильтрация от дициклогексилмочевины и обычная очистка. Метод довольно распространен, но ДЦГКДИ токсичен.

Получение неприродных пенициллинов путем отщепления ацильного остатка у пенициллинов G или V с последующим химическим ацилированием полученной 6-АПК открыло путь к пенициллинам второго поколения, которых насчитывается сейчас несколько тысяч.

Трансформированные молекулы пенициллина не только сохранили все ценные свойства антибиотиков, но и приобрели ряд новых ценнейших свойств,

таких как *кислотоустойчивость, устойчивость к β-лактамазе, широкий спектр действия.*

Рассмотрим отдельных представителей таких полусинтетических пенициллинов, условно разделив их по свойствам, приобретенным в результате превращений их молекул.

1-я группа. Кислотоустойчивые пенициллины, активные при приеме *per os*.

Для эффективного всасывания пенициллина при приеме *per os* важны два аспекта структурной организации молекулы:

- 1) устойчивость в кислой среде;
- 2) липофильность боковой цепи.

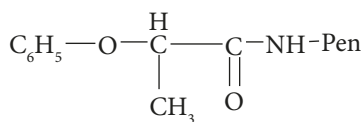
Было установлено, что устойчивость в кислой среде увеличивается при наличии в положении α радикала экзоциклической амидной группы электрон-акцепторного заместителя. У пенициллина V и его гомологов таким заместителем является оксифенильный.

Липофильность боковой цепи в молекуле пенициллина благотворно влияет на всасываемость в кишечнике. Однако при повышенной липофильности увеличивается связывание с белками крови, так что наличие длинной липофильной боковой цепи приводит к снижению активности.

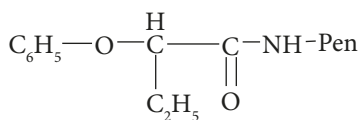
Большая часть пенициллинов этой группы являются α-производными феноксиметилпенициллина, который проявляет большую кислотостойкость в кислой среде желудка (схема 26).

Фенетициллин (α-феноксизтилпенициллин) в 2 раза активнее пенициллина V, хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта. Известно 2 изомера и рацемат. Получают ацилированием 6-АПК α-феноксипропионовой кислотой.

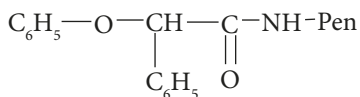
Пропициллин (α-феноксипропилпенициллин) получен ацилированием 6-АПК α-феноксимасляной кислотой. Преимуществом *фенбенициллина*



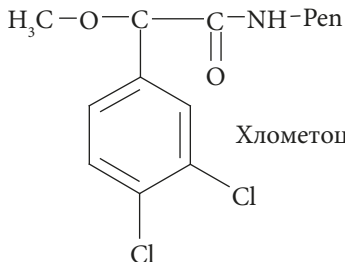
Фенетициллин



Пропициллин



Фенбенициллин



Хлометоциллин

Схема 26. Структуры кислотостойких пенициллинов

(α -феноксibenзилпенициллина) при приеме внутрь является более высокая концентрация в сыворотке крови (~ в 2 раза по сравнению с пенициллином V и фенетициллином). *Хлорметоциллин* (3,4-дихлор- α -метоксибензилпенициллин) также дает более высокий уровень концентрации в крови мышей по сравнению с пенициллинами G и V.

Эти четыре антибиотика (схема 26) отличаются от пенициллина V несколько более пролонгированным действием, а также более стабильны к действию фермента пенициллиназы.

2-я группа. Пенициллиназоустойчивые пенициллины.

В тех случаях, когда при α -C все три атома водорода замещены, у пенициллинов появляется активность в отношении продуцирующих пенициллиназы стафилококков. Одни относительно стабильны в кислой среде и могут применяться *per os* (изоксазолилпенициллины — *оксациллин*, *клоксациллин*, *флуклоксациллин*, *диклоксациллин*), другие — неустойчивы и применяются только парентерально (*метициллин*; схема 27).

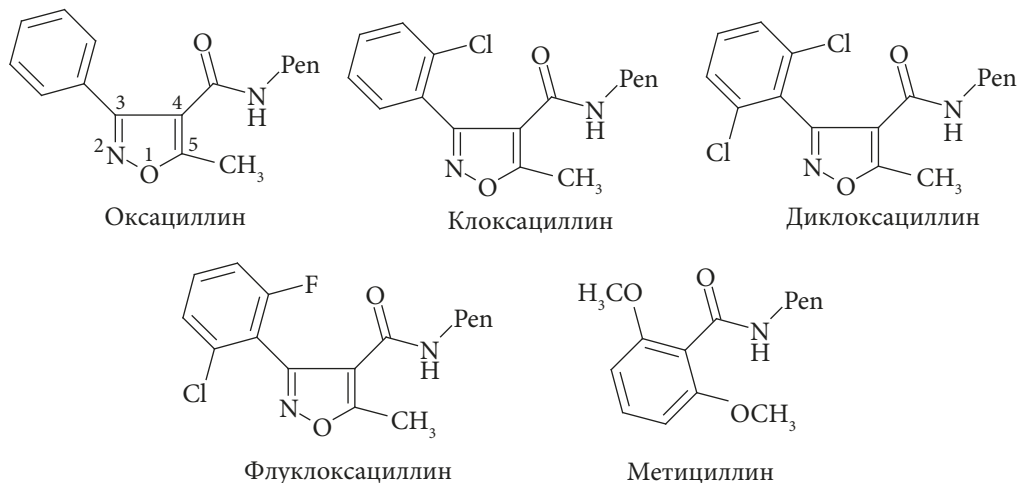


Схема 27. Структуры пенициллиназоустойчивых пенициллинов

Оксациллин — 5-метил-3-фенил-4-изоксазолилпенициллин производится хлорангидридным методом. Рекомендован при инфекциях, вызванных устойчивыми к пенициллинам G и V стафилококками. *Клоксациллин* — 5-метил-3-(*o*-хлорфенил)-4-изоксазолилпенициллин по действию близок к оксациллину, при этом концентрация в сыворотке крови в 1,7 раза выше. *Диклоксациллин* — 5-метил-3-(2,6-дихлорфенил)-4-изоксазолилпенициллин по действию аналогичен оксациллину. Концентрация в сыворотке крови в 3,5 раза выше, чем у оксациллина, и в 7 раз, чем у метициллина. Применяется перорально и парентерально. *Метициллин* — 2,6-диметоксифенилпенициллин применяется в виде Na-соли, новокаиновой и *N*, *N'*-дибензилэтилидендиаминовой соли. Он менее

стойко, чем пенициллин в кислой среде, применяется парентерально. Показан при инфекциях, вызванных резистентными к пенициллину G стафилококками.

3-я группа. Пенициллины широкого спектра действия.

Усилия ученых были направлены на синтез пенициллинов, потенциально активных в отношении грамотрицательных микроорганизмов, таких, которые практически нечувствительны к пенициллинам. Была установлена корреляция между структурой антибиотика и его активностью, показано, что присутствие полярной группы в положении α амидного заместителя увеличивает активность. Важна при этом и стереохимическая конфигурация молекулы.

Широким спектром антибактериального действия обладают *n*-аминобензилпенициллин и ампициллин (D(-)- α -аминобензил-пенициллин). Эти антибиотики активны в отношении грамположительных и грамотрицательных (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus mirabilis*) бактерий, применяются при лечении больных пневмонией, абсцессом легких, перитонитом, холециститом, сепсисом (схема 28).

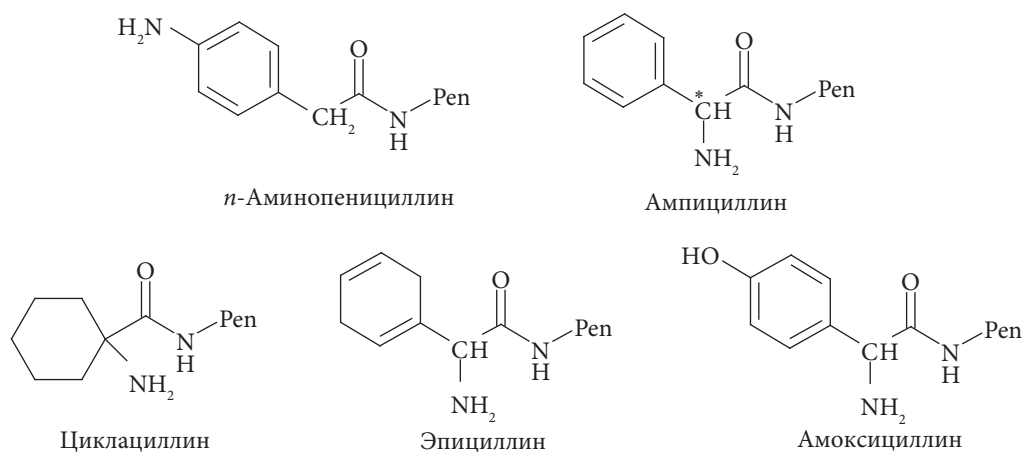


Схема 28. Структуры пенициллинов широкого спектра действия

Они кислотостойки, но легко расщепляются пенициллиназой. Применяются *per os*, но плохо всасываются, поэтому были получены многочисленные производные. Например, *циклациллин* лучше всего всасывается при приеме внутрь, но менее активен в отношении грамотрицательных бактерий. *Эпициллин* и *амоксициллин* почти полностью всасываются из ЖКТ и реже вызывают кишечные расстройства.

Тот факт, что активность антибиотика в отношении *E. coli* увеличивается при включении в молекулу в α -положение амидной группы слабополярной группировки, послужил основанием к поиску производных, содержащих в этом

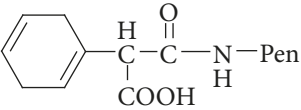
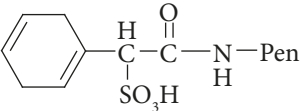
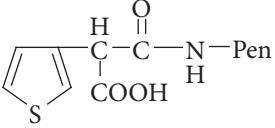
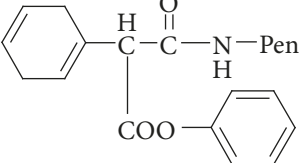
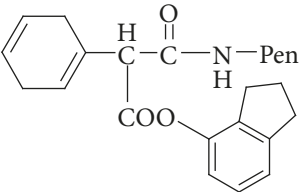
положении более полярные группировки, чтобы исследовать их активность в отношении *Pseudomonade* или *Proteus*.

Некоторые из полученных активных антибиотиков представлены в табл. 4.

Производные 1–3 достаточно активны в отношении *Proteus*, *Pseudomonade* и других грамотрицательных микроорганизмов и используются в клинике, но МПК (минимальная подавляющая концентрация) 12,5–25 мкг/мл (у ампициллина 0,3–0,5 мкг/мл), поэтому приходится применять высокие дозы — до 20–40 г в сутки. Эти антибиотики не всасываются при приеме внутрь, поэтому применяются парентерально.

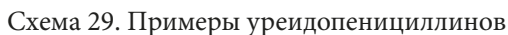
Таблица 4

**Структура пенициллинов, содержащих полярные группы
в α-положении ацильного заместителя**

№ п/п	R	Название антибиотика
1		Карбенициллин
2		Сульбенициллин
3		Тикарциллин
4		Карфециллин (гидролизуетс до карбенициллина)
5		Кариндациллин (гидролизуетс до карбенициллина)

Пенициллины, полученные ацилированием 6-АПК, — полусинтетические, это пенициллины 2-го поколения.

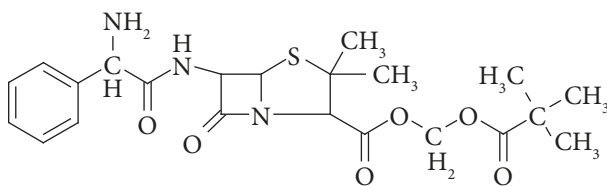
Часть из них опробована в клинике, другие проходят предклинические испытания. Практически важными из них являются, например, *ниперациллин*, полученный ацилированием фенилглицинового фрагмента ампициллина 4-этил-2,3-диоксопиперазин-1-карбонилхлоридом, и *азлоциллин*, полученный ацилированием имидазолин-2-он-1-карбонилхлоридом (схема 29).



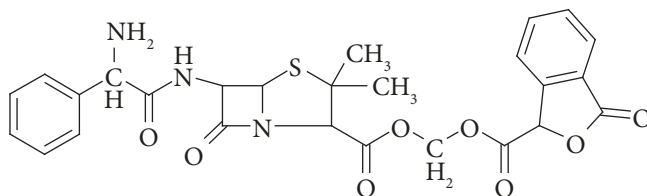
К особенностям уреидопенициллинов относится также возможность их применения в дозах в 2–4 раза меньших, по сравнению с карбенициллином, уменьшая при этом опасность нарушения электролитического баланса (все они моно-Na-соли). Уреидопенициллины являются в целом перспективной группой антибиотиков, конкурирующей с цефалоспоридами 3-го поколения.

Были получены сложные эфиры ампициллина по карбоксильной группе (пивампициллин, талампициллин, бакампициллин и др.), характеризующиеся

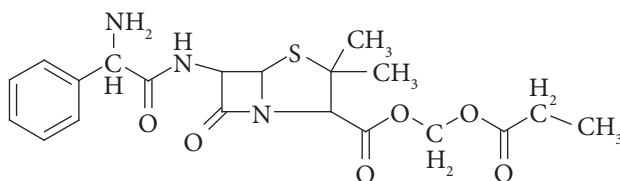
более полным всасыванием при приеме внутрь и созданием более высоких уровней антибиотика в организме (схема 30).



Пивампициллин



Талампициллин



Бакампициллин

Схема 30. Примеры сложных эфиров ампициллина

Получение пенициллинов синтетическим путем

В 1946 г. Дю Виньи с сотр. удалось осуществить синтез пенициллина G с выходом 0,03 %. Создание оптимальных условий для этапов синтеза позволило повысить выход до 0,22 %. В 1951 г. Шихан получил синтетический пенициллин V с выходом 0,1 %.

Поскольку выходы малы, а исходные продукты малодоступны, эти методы не могут конкурировать с биосинтетическими и полусинтетическими, хотя разработанные методики, особенно — замыкание β-лактамного кольца, сыграли большую роль в развитии химии пептидов.

6.1.3. Связь строения пенициллинов с антибиотическими свойствами

Сравнивая активность многих синтезированных и природных пенициллинов, была установлена корреляция между структурными особенностями молекулы и биологической активностью (схема 31).

Изучение для пенициллинов взаимосвязи «структура — биологическая активность» позволило сделать следующие выводы:

1. Специфичность биологического действия пенициллинов определяется в первую очередь наличием в их молекуле бициклической группировки из тиазолидинового и β -лактамного колец (пенам-ядра), поскольку расщепление или любое видоизменение, модифицирование этих колец приводит к снятию активности.

2. Биологической активностью обладают только пенициллины, у которых С-5 атом в пенаме имеет *R*-конфигурацию, обеспечивающую *цис*-конфигурацию ациламидной связи и тиазолидинового цикла по отношению к β -лактамному кольцу.

3. Окисление серы в положении 1 пенама с образованием 1-*S*-оксидов и 1-*S*-сульфонов ослабляет антибактериальные свойства соединений. Однако введение второго атома кислорода (*S*-сульфонилпроизводные) приводит к получению высокоактивных соединений — необратимых ингибиторов β -лактамаз.

4. Модификация заместителей в С-2 положении пенама с образованием 2- α - и 2- β -ацетоксиметильных производных приводит к существенному падению антибактериальной активности. Удаление метильных групп в С-2 положении не оказывает влияния на активность соединений в отношении грамотрицательных, но снижает активность в отношении грамположительных микроорганизмов.

5. Модификация карбоксильной группы в С-3 положении пенама, приводящая к ее удалению или образованию амидов, нитрилов, изоцианатов,

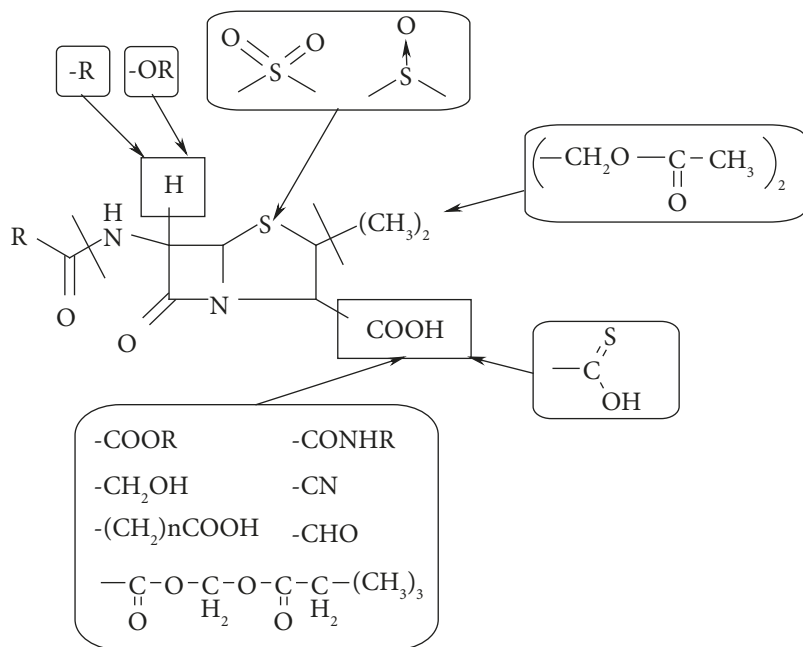


Схема 31. Изображение взаимосвязи «структура — биологическая активность» в ряду пенициллинов

альдегидов, спиртов, гомо- и дигомопроизводных, сопровождается более или менее резким снижением антибактериальной активности. Все эти соединения практического значения не имеют. Исключение составляют сложные эфиры, которые сами по себе также обладают очень низкой активностью, однако, благодаря наличию сложноэфирной связи, легко всасываются в кровь из ЖКТ и гидролизуются *in vivo* под действием эстераз с образованием кислот, обладающих высокой активностью. В связи с этим они находят применение в качестве так называемых *prodrugs* — *пролекарств* антибиотиков, которые легко всасываются при приеме *per os* (оральное введение). Образование солей по СООН группе не изменяет спектра действия, но ускоряет лечебный эффект за счет улучшения растворимости соединения (К, Na-соли) или приводит к пролонгации действия (если соли не растворимы в воде).

6. Модификация в положении С-5 пенама приводит к полной потере антибактериальных свойств соединения, во-первых, из-за увеличения прочности ациламидной связи в β -лактамном кольце и, во-вторых, из-за стерических затруднений при взаимодействии антибиотика с ПСБ.

7. Замена атома водорода в С-6- α -положении на CH_3 , OCH_3 группы приводит к снижению активности, при более крупных замещающих группах активность исчезает полностью.

8. Ацилирование аминоксигруппы пенама имеет ключевое значение с точки зрения создания новых лекарственных препаратов (6-АПК имеет только 1/200 активности пенициллина G).

Природа ацильного радикала существенна для проявления активности.

Проводящаяся в начале 60-х гг. XX в. интенсивная модификация N-ацильного фрагмента в 6- β -положении пенама привела к получению более 20 тыс. полусинтетических пенициллинов, из которых 37 получили широкое распространение как медицинские препараты. Полученные таким образом пенициллины превосходят исходный пенициллин G по кислотостойкости, активности, устойчивости к β -лактамазам, некоторые из них являются конкурентными ингибиторами β -лактамаз.

Остановимся подробнее на влиянии ацильного радикала на свойства пенициллина.

8.1. Установлено, что кислотостойкость пенициллина, характеризующаяся периодом полураспада (в минутах) при различных значениях pH среды и $t = 35^\circ\text{C}$, связана с силой кислоты, которой ацилирована 6-АПК. Чем больше степень электролитической диссоциации этой кислоты, тем более стабилен в кислой среде пенициллин.

Таким образом, стабильность пенициллинов в кислой среде увеличивается с повышением степени диссоциации кислот, ацилирующих 6-АПК.

8.2. Устойчивость к пенициллиназе (β -лактамазе) определяется стерическим влиянием ацильного остатка на β -лактамное кольцо. Очевидно, активный центр этого фермента взаимодействует именно с β -лактамным кольцом (оно раскрывается).

Стерические препятствия создают заместители при α -углеродном атоме, связанном через карбонил с 6-АПК.

Создать пенициллины с таким геометрическим строением боковой группы, которая создавала бы стерические препятствия для действия β -лактамазы на β -лактамное кольцо, не представляет в настоящее время особой трудности. Однако к пенициллинам предъявляется еще ряд требований (активность, отсутствие токсичности), удовлетворить которые весьма трудно или невозможно. Вот почему из 1 000 пенициллинов только один находит применение в медицине.

Если α -углерод заключен в пятичленную структуру (изоксазолпенициллины), для достижения определенного стерического эффекта один или оба заместителя в *орто*-положении должны быть относительно велики по объему (фенил у оксациллина, замещенный фенил у клоксациллина, диклоксациллина).

Если α -углерод заключен в шестичленную структуру, тогда два даже небольших заместителя в *орто*-положении могут оказать экранирующий эффект. Например, две OCH_3 группы в метициллине. Однако одного небольшого заместителя недостаточно. Если же заместитель в *орто*-положении объемный, например, COOH группа или фенил, пенициллин устойчив к лактамазе.

Широкий спектр действия пенициллинов связан с наличием в остатке у α -углеродного атома (по отношению к $\text{C}=\text{O}$) свободных полярных $-\text{NH}_2$ или COOH групп (ампициллин, карбенициллин).

Детально изучены и более частные закономерности, например, влияние заместителей в *n*-положении фенильного кольца пенициллина G, сравнительная активность производных бензилпенициллина и их фенильных аналогов, гетероциклических и алифатических систем в составе ацильной группы и многое другое.

В пенициллинах широкого спектра действия изучено влияние ацилирования NH_2 -группы и этерификации карбоксильной группы. Показано, что уреидопроизводные ампициллина (пиперациллин, азлоциллин) обладают лучшими фармакокинетическими характеристиками и устойчивы к действию β -лактамаз. Эфиры ампициллина и карбенициллина лучше всасываются при приеме *per os* и не нарушают электролитический баланс организма.

После установления корреляции между строением и активностью пенициллинов стало возможным проводить направленный синтез пенициллинов, т. е. получать пенициллины с определенными заданными свойствами.

6.2. Цефалоспорины

Второй наиболее важной для медицины группой β -лактамных антибиотиков являются цефалоспорины, обладающие широким спектром антибактериального действия в отношении пенициллинрезистентных бактерий.

В настоящее время цефалоспорины по жизненной значимости, тоннажу производства и стоимости занимают первое место в номенклатуре антимикробных агентов и выдерживают нарастающую конкуренцию фторхинолонов, новых макролидов и других антибиотиков.

6.2.1. Природные цефалоспорины

Штаммы гриба *Cephalosporium acremonium* (ветви с головоподобными семенами) были выделены итальянским врачом Джузеппе Бротзу в 1945 г. (в 1948 г. опубликованы исследования) из вод Средиземного моря на о. Сардиния вблизи места сброса сточных вод (стоки, перемешанные с илом). Этот продуцент подавлял рост *Salmonella paratyphi B*, *Yersinia pestis*, *Brucella melitensis*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*. Штаммы кишечной палочки и шигелл были резистентны. Поскольку в послевоенной Италии у Бротзу возникли трудности с финансированием, он обратился в Оксфордский университет к одному из авторов пенициллина Говарду Флори, который подключил к работе Э. Абрахама и Г. Ньютона. В Англии штамм переименовали в *Acremonium chrysogenum* (ветви, продуцирующие золото), что оказалось весьма удачным, принимая во внимание будущую историю ценнейших лекарственных препаратов.

Изучение продуктов метаболизма гриба оказалось очень сложной задачей. Вначале был экстрагирован в органический растворитель антибиотический комплекс, действующий на грамположительные бактерии, он получил рабочее название цефалоспорин Р, так как действовал на грамположительные (*positiv*) бактерии. Комплекс содержал тетрациклические тритерпены, индивидуальным представителем которых оказалась гельволевая кислота (фумигацин), уже описанная в других лабораториях. Продуцентом фумигацина был и *Asp. fumigatus*. После удаления цефалоспорина Р в культуральном фильтрате было обнаружено в минорных количествах второе активное начало с более широким антимикробным спектром, включавшим и грамотрицательные (*negative*) бактерии. Ему было дано рабочее название цефалоспорин N, однако при дальнейшем изучении его переименовали в пенициллин N, поскольку это был пенициллин с D- α -аминоадипиновой кислотой в боковой цепи (вместо фенилуксусной).

Во время работы с пенициллином N был замечен еще один минорный антибиотик, образуемый средиземноморским штаммом *Acremonium chrysogenum*. Этот антибиотик получил название цефалоспорин С, прилагавшееся уже к оригинальному, индивидуальному веществу. Его было так мало, что открытие

можно было считать случайностью. В то же время цефалоспорин С отличался от цефалоспорина N следующими важными признаками: большей стабильностью, устойчивостью к пенициллиназе, отсутствием среди продуктов гидролиза D-пеницилламина. Накопленный с большими трудностями препарат показал способность защищать мышей от инфекций, вызванных стрептококками и образующими пенициллиназу стафилококками.

К работе подключились генетики (поскольку обнаружился антибиотик, по которому следовало отбирать мутанты). Более продуктивные штаммы позволили накопить антибиотик и установить его полную структуру (Э. Абрахам, Г. Ньютон, 1961; схема 32). Данные Э. Абрахама и Г. Ньютона вначале вызвали дискуссию, но затем были подтверждены в других лабораториях новыми для того времени методами — рентгеновской кристаллографией и ЯМР.

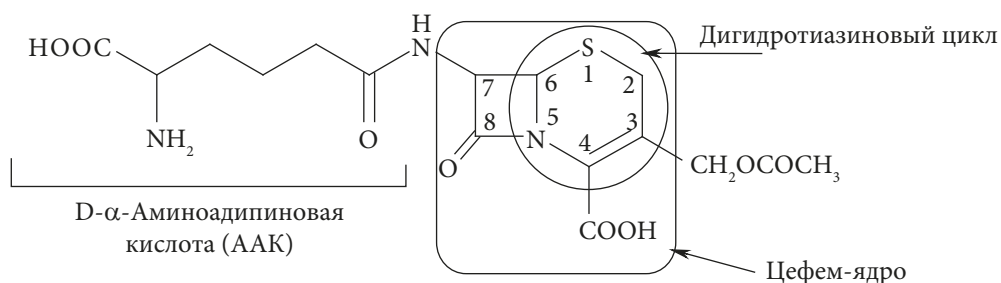


Схема 32. Строение цефалоспорина С

Молекула цефалоспорина С содержит две кислотные карбоксильные группы (рКа — 2,60 и 3,10) и одну основную аминогруппу (рКа — 9,80). Цефалоспорин С устойчив в кислых средах, сравнительно устойчив в растворах, содержащих ионы металлов (Zn, Cu, Pb). В щелочных средах быстро инактивируется.

Не слишком эффективный, плохо всасывающийся при приеме внутрь цефалоспорин С привлек внимание исследователей тем, что, несмотря на большое сходство с пенициллином, более активен по отношению к грамотрицательным бактериям и пенициллиназоустойчив. Может применяться при возникновении устойчивости к пенициллину у стафилококков и других микроорганизмов. Особенно активен в отношении холерного вибриона.

6.2.2. Полусинтетические цефалоспорины и их получение

Все неприродные цефалоспорины получают исключительно путем полусинтеза. Структура цефем-ядра, по сравнению со структурой пенем-ядра, открывает большие возможности для модификации молекулы. Выбор заместителей в цефем-ядре, их сочетание, обеспечивающее лучшие медико-биологические свойства, — вот задача, стоящая перед химиками.

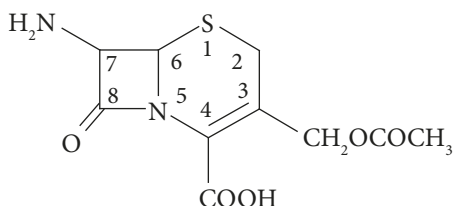
Цель модификации природного цефалоспорины С:

1. Увеличение активности.
2. Расширение спектра действия полученных антибиотиков — получение антибиотиков, активных в отношении возбудителей инфекций, резистентных к другим антибиотикам.
3. Увеличение устойчивости к лактаме.
4. Улучшение фармакокинетических свойств — улучшение всасываемости из желудочно-кишечного тракта, пролонгация действия, улучшение растворимости.

Получение цефалоспоринов модификацией ацильного остатка у аминокислоты при C-7

Введение заместителей в аминокислотную группу боковой цепи (аминоадипиновой кислоты) цефалоспорины С не дало положительных результатов. Важной модификацией, как и для пенициллинов, явилась замена ацильного остатка у аминокислоты, находящейся в положении 7.

Однако чтобы приступить к этой модификации, необходимо было предварительно отщепить ацильный остаток природного цефалоспорины С, т. е. аминоадипиновую кислоту, с получением ключевого соединения — 7-аминоцефалоспориновой кислоты (7-АЦК; схема 33).



7-Аминоцефалоспориновая кислота
(7-АЦК)

Схема 33. Строение 7-аминоцефалоспориновой кислоты

Методы получения 7-АЦК

Продукцент пенициллина образует 6-АПК при ферментации без предшественника; помимо этого более эффективно 6-АПК получают путем обработки пенициллина G ферментом пенициллинацилазой.

Ферментация без предшественника боковой цепи при C-7 цефалоспорины С не привела к получению 7-АЦК, не было также обнаружено и цефалоспоринацилазы. Остался путь удаления боковой цепи — химический гидролиз.

Впервые 7-АЦК была получена мягким кислотным гидролизом цефалоспорины С с выходом 1 % (Э. Абрахам, Г. Ньютон, 1961).

Первый практически приемлемый метод основан на образовании аминокислотной группы легко гидролизуемого иминолактона путем внутримолекулярной циклизации под влиянием хлористого нитрозила (NOCl; схема 34).

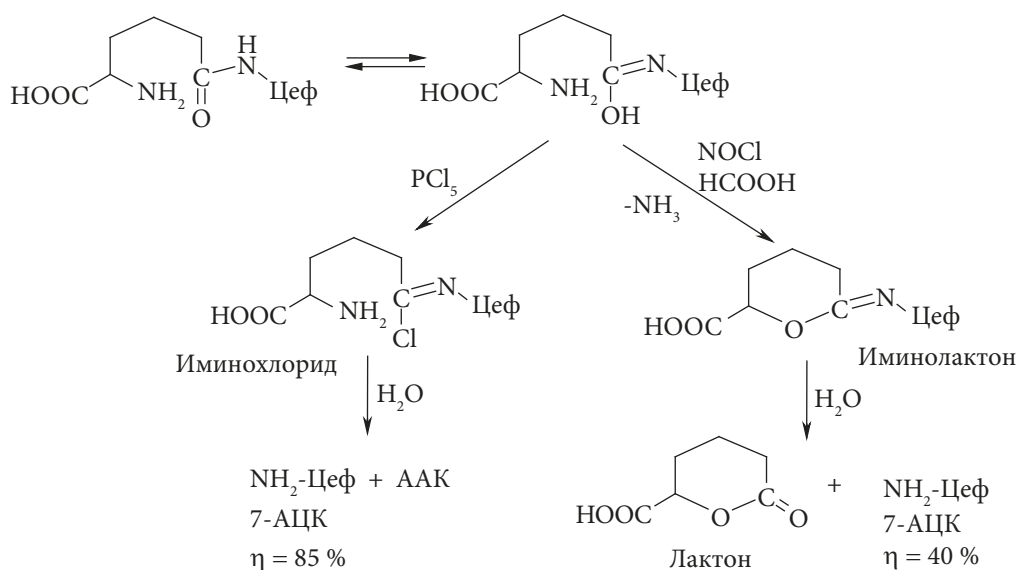


Схема 34. Методы химического гидролиза цефалоспорины С

Однако наиболее эффективным методом является взаимодействие цефалоспорины С с PCl_5 при пониженной температуре с образованием легко гидролизуемого иминоклорида (см. схему 34).

Методы ацилирования 7-АЦК

Для ацилирования 7-АЦК применяются те же методы, что и для ацилирования 6-АПК, т. е. ангидридами, хлорангидридами, смешанными ангидридами кислот и карбоновыми кислотами в присутствии карбодиимидов.

Цефалоспорины, полученные этим путем, относятся большей частью к *цефалоспоринам 1-го поколения*.

Первым цефалоспорином, полученным ацилированием 7-АЦК, был аналог бензилпенициллина — *цефалорам*, антибиотик с гораздо большей активностью, чем природный цефалоспорин С (Э. Абрахам; схема 35).

Наиболее ценными антибиотиками, полученными этим способом, были *цефалотин* и *цефалоглицин* (см. схему 35). Цефалотин применяется в виде Na-



Схема 35. Цефалоспорины 1-го поколения, полученные методом ацилирования 7-АЦК

соли. 7-АЦК ацилирована хлорангидридом 2-тиенилуксусной кислоты в системе H_2O -ацетон. Препарат активен по отношению к пенициллиноустойчивым формам грамположительных и грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *Proteus mirabilis*), менее токсичен, чем пенициллин, но имеет следующие недостатки:

1. Плохо всасывается при приеме внутрь;
2. Внутримышечное введение болезненно;
3. Недостаточно широк спектр действия;
4. Быстро выводится из организма ($T_{1/2} = 4$ ч).

Было показано, что фенилглициновая боковая цепь, содержащаяся в ампициллине, является прекрасным заместителем и для цефалоспоринов. Получена целая серия активных цефалоспоринов с фенилглициновым остатком, из которых самым активным является цефалоглицин. Это первый пероральный препарат цефалоспорин, он обладает хорошей всасываемостью.

Получение цефалоспоринов модификацией остатка при С-3

При клинических испытаниях оказалось, что ацетоксиметиленовая группа при С-3 легко гидролизуется до спиртовой со снижением активности. Следовательно, ее необходимо было модифицировать.

Важными модификациями этого положения в молекуле цефалоспоринов являются гидрогенолиз с образованием дезацетоксицефалоспоринов (схема 36) и нуклеофильное замещение ацетоксигруппы (схема 37).

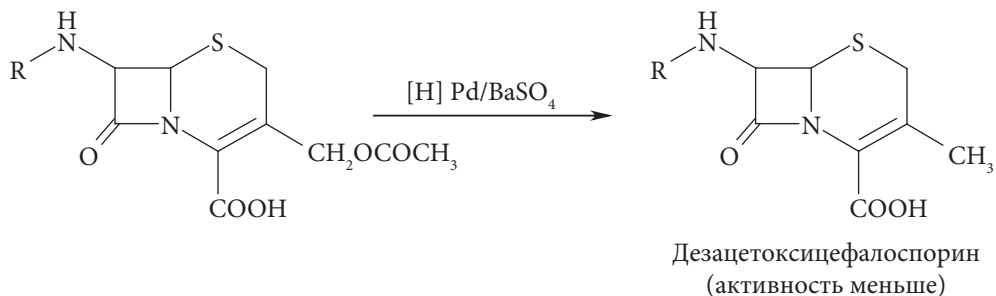
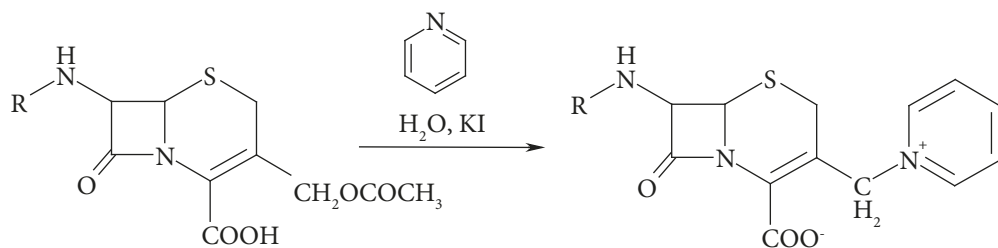


Схема 36. Реакция гидрогенолиза цефалоспоринов

Замещение ацетоксигруппы проводят различными нуклеофильными агентами: $AlkO$ (алкокси), AcO (ацилокси), $AlkS$ (алкилтио), AcS (ацилтио), $OCONH_2$ (карбомилокси), $OCSNH_2$ (тиокарбомилокси), амидными группами, ароматическими и гетероциклическими радикалами.

Реакция протекает в протонном растворителе (воде или формамиде с добавлением KI).



Цефалоспорин С (R = остаток ААК)

Цефалоспорин СА (R = остаток ААК)

Схема 37. Нуклеофильное замещение ацетоксигруппы в цефалоспорилах

Цефалоспорин C_A , полученный замещением ацетоксигруппы на пиридин, обладает более высокой активностью, чем природный цефалоспорин С.

Получение цефалоспоринов модификацией по $COOH$ группе.

Синтез сложных эфиров и амидов

При получении сложных эфиров цефалоспоринов используют диазосоединения, например диазометан, фенилдиазометан, этиловый эфир диазоуксусной кислоты (схема 38).

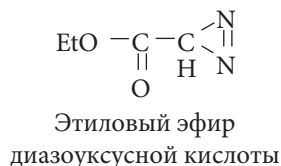
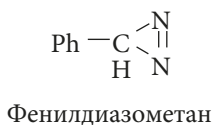
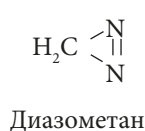


Схема 38. Диазосоединения в получении эфиров цефалоспоринов

Амиды получают активированием карбоксильной группы ДЦГКДИ и затем действуют амином (метод был описан выше в разд. 6.1.2).

И эфиры, и амиды цефалоспорина С менее активны, чем цефалоспорин С. Однако поскольку в молекуле цефалоспорина имеется несколько участков, которые можно модифицировать, то при модификации более чем в одно положение трудно было заранее установить (предсказать) корреляцию между структурой заместителя и биологическим действием, поскольку изменение биологических свойств препарата зависит не от суммы эффектов отдельных замещений, а от результата их комбинирования. Для поиска таких корреляций (связей) «структура — действие» был проведен большой ряд исследований. Ниже представлены наиболее важные результаты.

Получение цефалоспоринов одновременной модификацией боковых цепочек при C-7 и C-3

Наиболее интересными оказались два ряда производных — ацильные производные 7-АДЦК и ацильные производные цефалоспоринов с гетероциклическим радикалом у C-3.

7-АДЦК — 7-дезацетоксицефалоспориновая кислота может быть получена тремя способами (схема 39): из цефалоспорина гидрогенолизом с последующим гидролизом с использованием нитрозилхлорида; гидрогенолизом 7-АЦК и цепочкой превращений из пенициллинов.

Ацильные производные 7-АДЦК получают ацилированием 7-АДЦК. Способы ацилирования те же, как и 7-АЦК, но предварительно защищают COOH группу этерификацией.

Так в медицине применяют *цефалексин*. Препарат отличается широтой терапевтического действия и хорошей всасываемостью при приеме *per os*, особенно при заболеваниях дыхательных путей — пневмонии, абсцессе легких (схема 40).

Препарат *цефрадин* по спектру действия близок к цефалексину (аналогу эпициллина, схема 40).

Интересно сравнить биологическую активность разных производных с фенилглициновым остатком (табл. 5).

Более низкая активность дезацетоксицефалоспоринов цефалексина и цефрадина компенсируется большей стабильностью *in vivo* и лучшей всасываемостью.

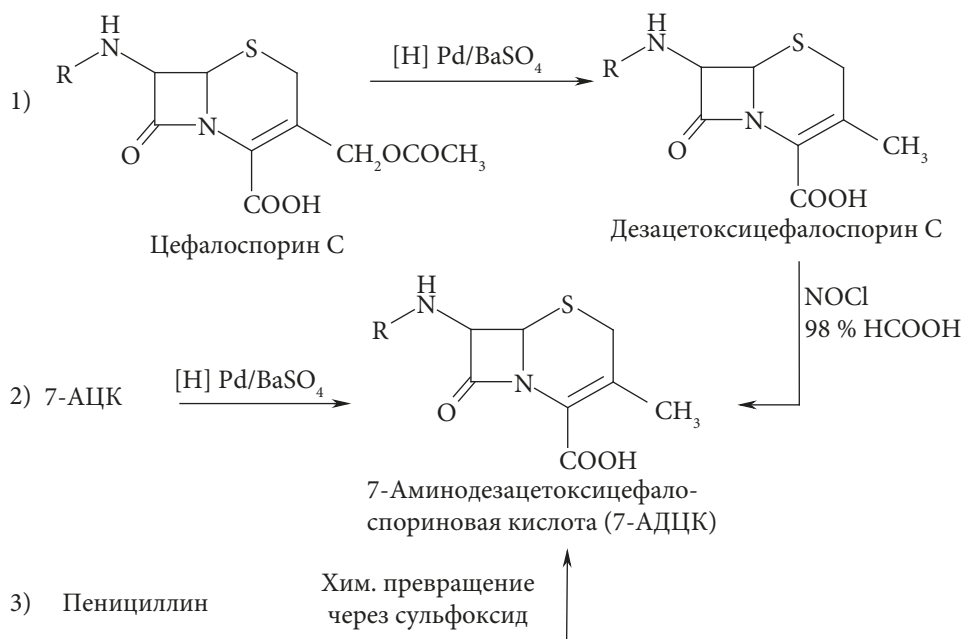


Схема 39. Способы получения 7-АДЦК

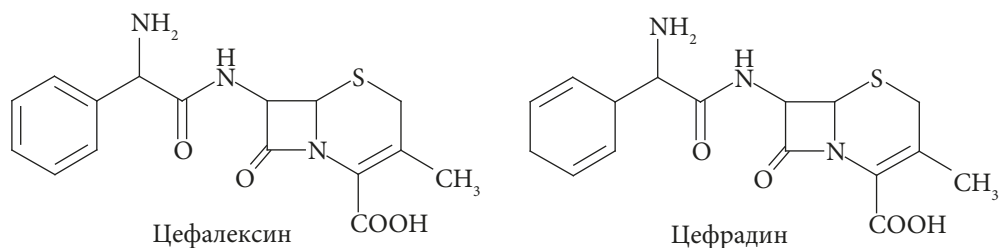


Схема 40. Строение дезацетоксицефалоспоринов

Таблица 5

Минимальные подавляющие концентрации и максимальный уровень в крови цефалоглицина, цефалексина и цефрадина

Антибиотик	Минимальная подавляющая концентрация, МПК в мкг/мл		Максимальный уровень в крови у человека, у. е.
	<i>S. aureus</i> грам(+)	<i>E. coli</i> грам(-)	
Цефалоглицин	1,6	3,2	1
Цефалексин	1,6	12,5	20
Цефрадин	6,4	12,5	15

Цефалоспорины с гетероциклическими группировками в положении С-3 получают реакцией нуклеофильного замещения ацетоксигруппы при С-3. Так как реакции нуклеофильного замещения у метиленовой группы при С-3 идут легко только у *N*-ацилированных соединений, то синтез осуществляется в соответствии со схемой 41.

Реакция замещения протекает в протонном растворителе (вода и формид) с добавлением КІ. Выход ~75 %.

Наиболее благоприятное сочетание заместителей дало активные цефалоспорины, представленные на схеме 42.

Цепорин и кефзол обладают широким спектром действия, активны при заболеваниях, вызванных чувствительными к ним грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами, при тяжелых инфекциях дыхательных путей, раневых инфекциях, инфицированных ожогах, перитонитах, инфекциях мочевых путей. Влияние отдельных заместителей и их сочетания можно проследить по табл. 6.

Цефалоспорины 2-го поколения

Изучение производных полусинтетических пенициллинов показало, что замещение водорода у α-метиленовой группы боковой цепи на ОН и NH₂ группы расширяет спектр действия, а объемные заместители у этого углеродного атома затрудняют подход к активному центру антибиотика β-лактамаз, таким образом увеличивают стабильность соединения к их действию. Подобная модификация

оказалась эффективной и для цефалоспоринов. Цефалоспорины с таким типом боковой цепи стали известны как цефалоспорины 2-го поколения. Наиболее известные из них представлены на схеме 43.

Цефуроксим — соединение, в котором α -метиленовая группа модифицирована в метоксииминогруппу, — наиболее широко применяется среди цефалоспоринов 2-го поколения.

Цефалоспорины 2-го поколения более стабильны к гидролитическому действию β -лактамаз грамотрицательных бактерий, что и определяет их большую активность по сравнению с полусинтетическими пенициллинами и цефалоспорины 1-го поколения в отношении энтеробактерий, образующих β -лактамазу.

Цефалоспорины 3-го поколения

В середине 70-х гг. XX в. почти одновременно три крупнейшие лаборатории получили аминотиазолилметоксимовые цефалоспорины (АТМО). Логика получения боковой цепи этих соединений вытекает из структурных черт антибиотиков 1-го и 2-го поколений. Первое соединение, полученное таким

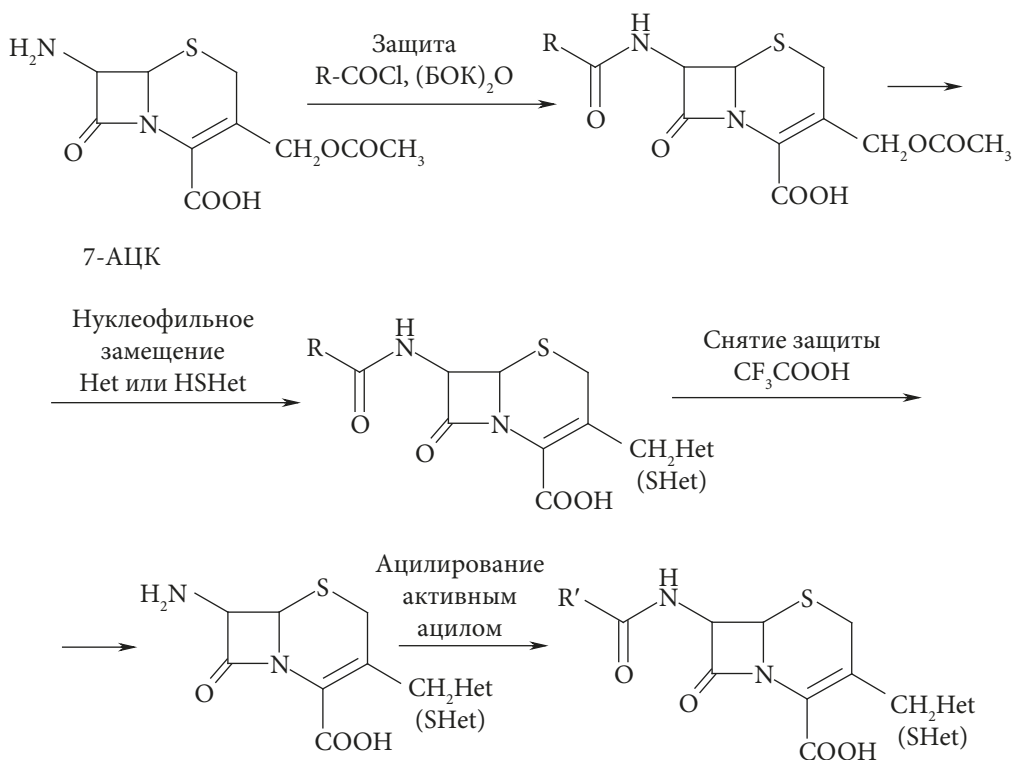
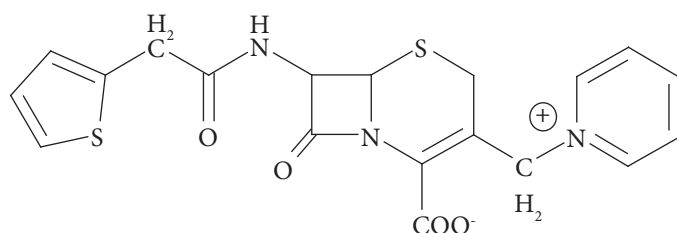


Схема 41. Получение цефалоспоринов с гетероциклическими заместителями в положении С-3

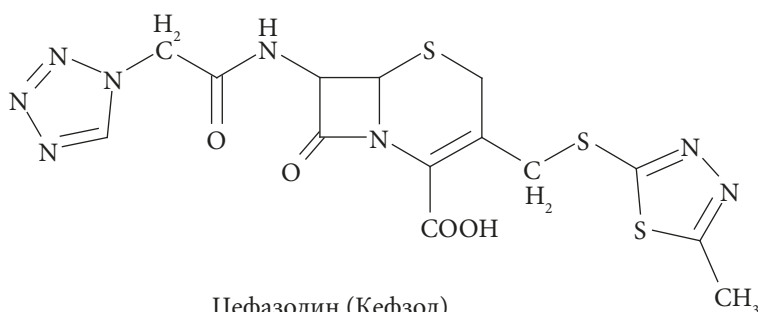
образом, — *цефотаксим* — стало родоначальником цефалоспоринов 3-го поколения (схема 44).

Были получены модификации, затрагивающие фактически каждое положение молекулы.

Было отмечено, что почти любое нуклеофильное замещение ацетоксиметиленовой группы в С-3 положении молекул цефалоспоринов 3-го поколения приводило к появлению соединения с высокой антимикробной активностью и разным профилем антимикробного действия.



Цефалоридин (Цепорин)



Цефазолин (Кефзол)

Схема 42. Цефалоспорины 1-го поколения
с гетероциклическими заместителями в положении С-3

Таблица 6

**Сравнительная антибактериальная активность природных
и полусинтетических цефалоспоринов 1-го поколения**

Микроорганизмы	Минимальная подавляющая концентрация МПК, мкг/мл			
	Цефалоспорин С	Цефалоспорин С _А	Цефалотин	Цепорин
Золотистый стафилококк	62	8	0,1	0,024
Пневмококки (грам +)	31	2,1	0,024	0,006
Брюшнотифозная палочка (грам -)	15,6	15,6	3,1	3,1

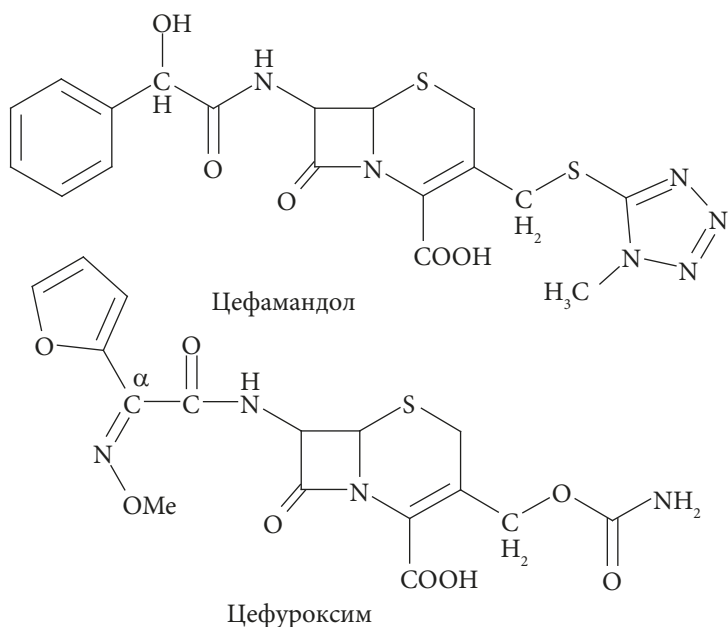


Схема 43. Цефалоспорины 2-го поколения цефамандол и цефуросим

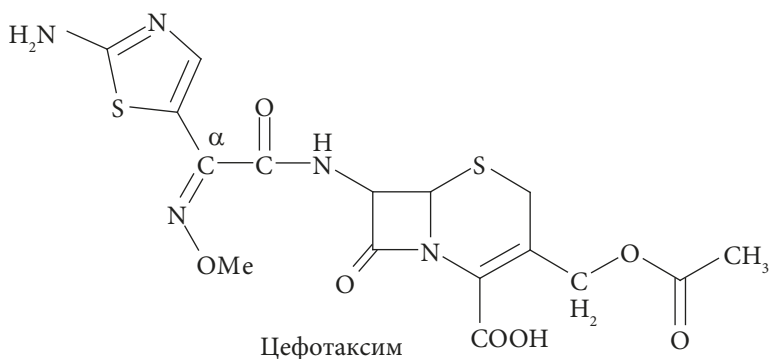


Схема 44. Строение цефотаксима

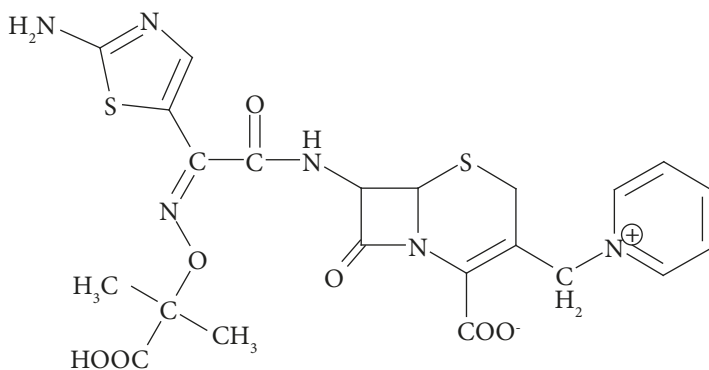
Высокоактивными оказались производные цефотаксима с пиридиновыми, тиазольными, тетразольными и другими циклами в положении C-3, при сохранении заместителя при C-7.

Модификации метоксिमовой группировки в еще большей степени увеличивали устойчивость цефалоспоринов к β -лактазам грамотрицательных бактерий и сообщали им широкий спектр действия. Многие оксимы, метоксимы, оксимимитирующие соединения, производные цефотаксима проявили суперактивность.

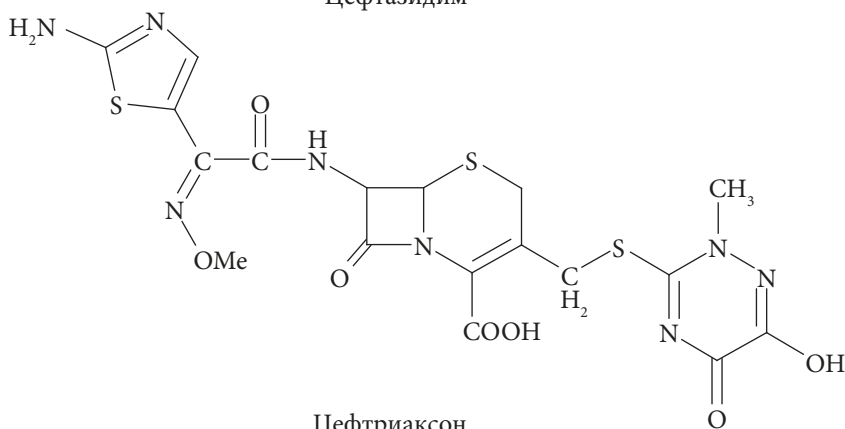
По широте спектра действия, переносимости, степени антибактериальной активности лучшим среди современных цефалоспоринов 3-го поколения можно считать *цефтазидим* (схема 45). По фармакокинетическим характеристикам

лучшим является *цефтриаксон* (схема 45), период полувыведения которого ($T_{1/2}$) равен 8 ч, т. е. его можно вводить 1-2 раза в сутки.

Представляет интерес сравнение структуры и спектра действия цефалоспоринов 1-го поколения *цефалоридина* (цепорина) и цефалоспоринов 3-го поколения — *цефтазидима*. Заместители при С-3 у них одинаковые (пиридинийметиленовые). Оба препарата обладают высокой активностью в отношении одних и тех же микроорганизмов, обусловленной исключительной проникающей способностью этих веществ через пориновые каналы клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Однако цефалоридин нестабилен в отношении цефалоспориназ, спектр его действия ограничивается традиционными микроорганизмами, чувствительными к цефалоспоринов 1-го поколения. Цефтазидим, напротив, стабилен к действию большинства цефалоспориназ благодаря оксимной группе. Вследствие этого у него широкий спектр действия и высокая эффективность в отношении инфекций, вызванных грамотрицательными микроорганизмами, наиболее сильно проявляемая в отношении инфекций, вызванных *Pseudomonas aeruginosa*.



Цефтазидим



Цефтриаксон

Схема 45. Цефалоспорины 3-го поколения цефтазидим и цефтриаксон

В целом цефалоспорины 3-го поколения отличаются от первого и второго поколений по спектру антибактериального действия (активны в отношении неспорообразующих грамотрицательных анаэробов, синегнойной палочки и других неферментирующих бактерий), фармакокинетическим свойствам (большое значение $T_{1/2}$), устойчивости к β -лактамазам, хорошо переносятся.

Показано, что только *цис*-оксимы и их аналоги обладают повышенной антибактериальной активностью. Это указывает на важное значение близости оксимной группы к амидной связи, прилегающей к β -лактамному кольцу.

Относительно недавно в медицинскую практику введен *цефалоспорин 4-го поколения* — *цефепим* (схема 46).

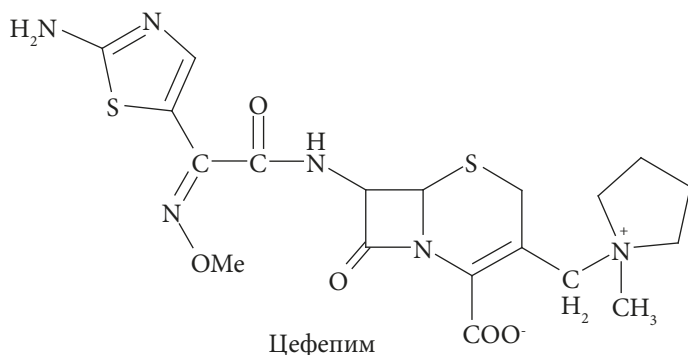


Схема 46. Цефалоспорин 4-го поколения цефепим

Цефепим обладает необычными биологическими свойствами: *очень быстрым транспортом* в периплазматическое пространство грамотрицательных бактерий и *низким сродством* к β -лактамазам. Дело в том, что все цефалоспорины в той или иной степени индуцируют биосинтез большого количества β -лактамаз, которые инактивируют антибиотик, связываясь с ним в периплазматическом пространстве, даже если не происходит гидролиза β -лактамного кольца. У цефепима *значительно ниже индукция устойчивых штаммов*. Это объясняется очень низкой (в 50–100 раз ниже, чем у цефтазидима) мерой сродства цефепима к ферменту (лактамазе) грамотрицательных бактерий.

Получение цефалоспоринов одновременной модификацией по С-3, С-7 и С-4 положениям. (Эфиры цефалоспоринов)

Одновременно с введением неприродных ацильных остатков в аминогруппу в положении 7 и модификации заместителя при С-7 были проведены реакции этерификации карбоксильной группы в положении С-3 цефалоспоринов. Как и у пенициллинов, эти производные цефалоспоринов являются *пролекарствами*, активными только *in vivo*. Это пероральные формы антибиотиков, не-

устойчивые в кровяном русле, сыворотке крови, быстро деэтерифицируются с освобождением натриевой соли антибиотиков.

Широко применяемые в медицине *ацетоксиэтиловый эфир цефуроксима* (*цефуроксима аксетил*) и пивамоильные эфиры *цефтерам* и *цефтамет* приведены на схеме 47.

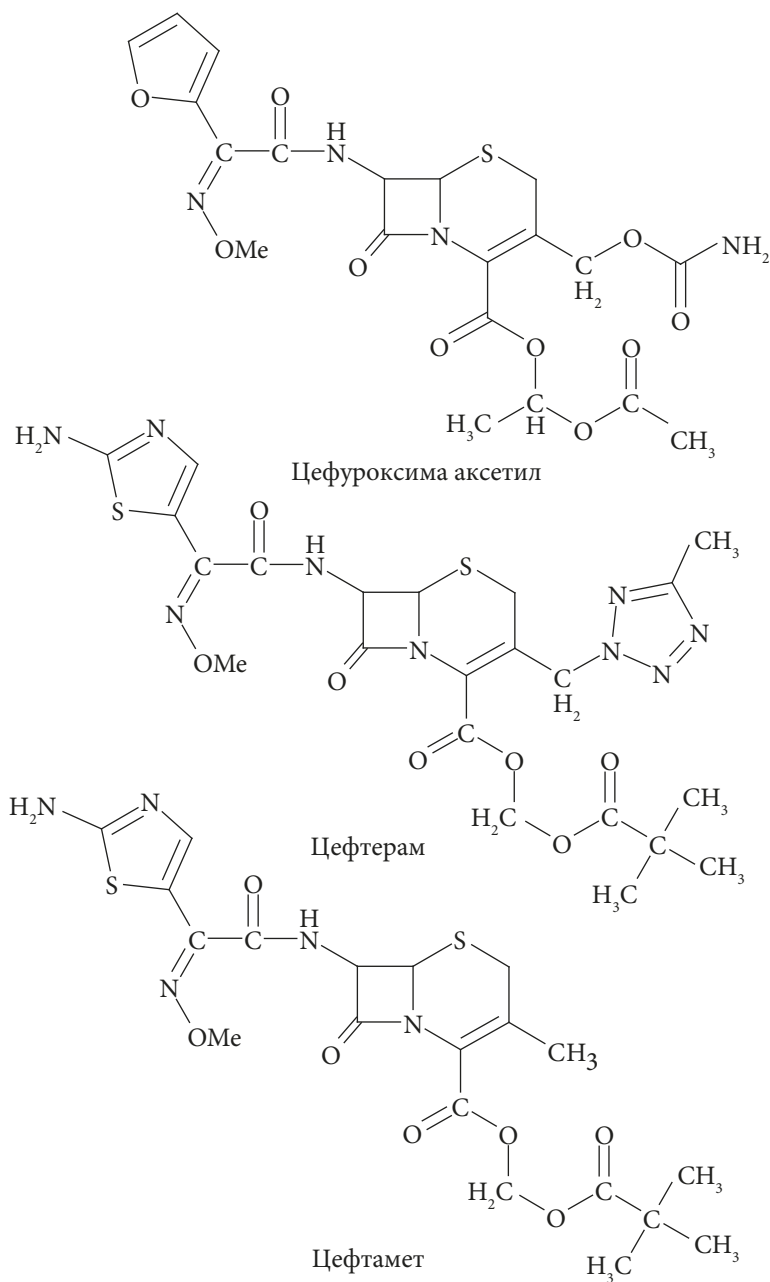
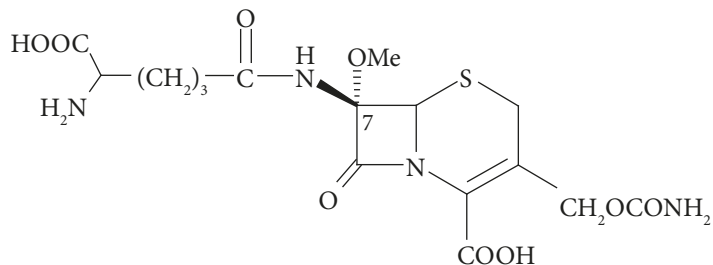


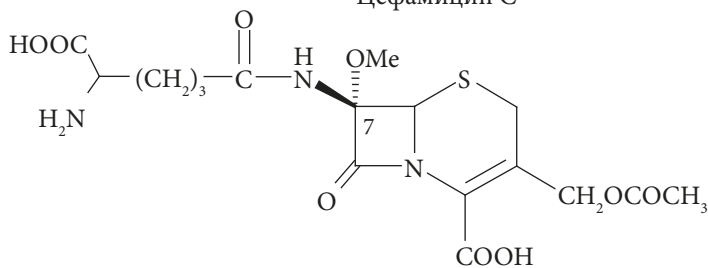
Схема 47. Эфиры цефалоспоринов

Получение цефалоспоринов введением заместителей в С-7- α , С-3 положения, NH_2 группу в С-7- β положении. Цефамицины

В 1971 г. из культур актиномицетов рода *Streptomyces* были выделены цефалоспорин с метоксигруппой в С-7- α положении (цефамицин С) и, как минорная примесь, 7(α)-метоксицефалоспорин С (схема 48).



Цефамицин С



7- α -Метоксицефалоспорин С

Схема 48. Эфиры цефалоспоринов

У этих антибиотиков была обнаружена высокая активность в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов при повышенной стабильности к β -лактамазам. Поэтому цефамицин С, как и цефалоспорин С, явился хорошим исходным материалом для синтеза различных производных. Первые исследования были направлены на разработку способов введения различных алкильных и алкоксигрупп: CH_3 , CH_3S , C_2H_5 , $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$, CH_2OH , CHO и др.

Ниже (схема 49) представлены отдельные представители группы цефамицинов.

Их активность близка к активности цефалоспоринов 2-го поколения. Используются в клиниках ряда стран. Лечат заболевания, вызванные грамотрицательными и грамположительными бактериями (*Proteus*, *Bacteroides*). К цефамицинам 3-го поколения принадлежит *цефбуперазон*. Он отличается высокой активностью в отношении ряда инфекций: *Haemophilus influenzae*, *Bacteroides fragilis* и несколько более низкой антистафилококковой активностью. Препарат обнаружил хороший терапевтический эффект в опытах *in vivo* и при клинических испытаниях.

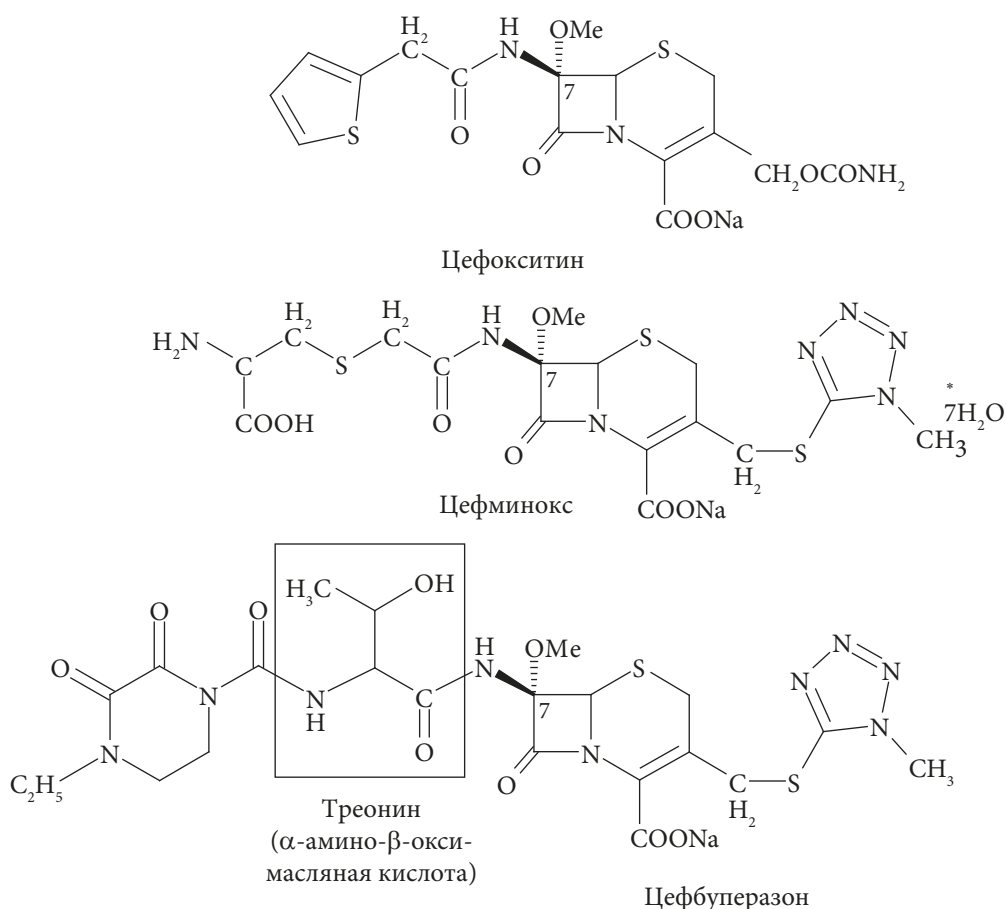
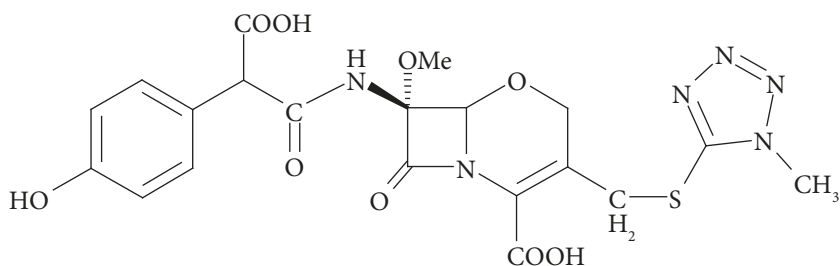


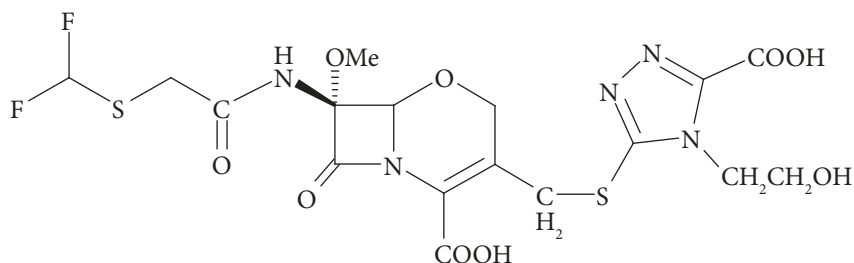
Схема 49. Эфиры цефалоспоринов

Цефалоспорины с модификацией в дигидротиазиновом кольце

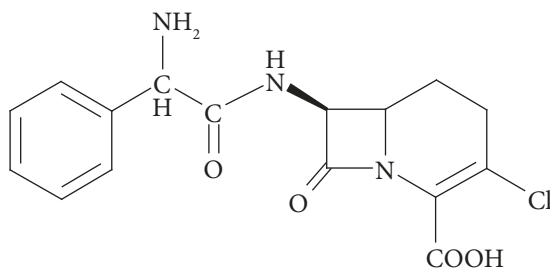
Требования к структуре, которые должны быть выполнены для сохранения активности, в случае цефалоспоринов несколько менее строгие, чем в случае пенициллинов. Размыкание колец, составляющих ядро молекулы, или насыщение двойных связей тоже приводит к полной инактивации препаратов, но другие модификации не сопряжены с потерей активности. Например, введение метоксильной группы в положение 7 сообщает полезные свойства (в пенициллинах — потеря активности). Наиболее важно, что у цефалоспоринов атом серы дигидротиазинового кольца может быть замещен на кислород или CH_2 группу без значительной потери активности. Это путь к совершенно новой серии производных: *оксацефемам* и *карбацефемам*. В клинике применяются оксацефемы — *моксалактам*, *фломоксеф* и карбацефем — *карбацефаклор* (аналог цефаклора; схема 50).



Моксолактam



Фломоксеф



Карбацефаклор

Схема 50. Примеры оксацефемов и карбацефема

Моксолактam избирательно эффективен по отношению к псевдомонадам (превосходит все известные антибиотики), действует также на другие грам-отрицательные бактерии.

Фломоксеф — антибиотик широкого спектра действия, высокостабилен к действию большинства бактериальных β -лактамаз. Обладает противобактериальной активностью, распространяющейся на бактероиды, клостридии, пептострептококки, неактивен в отношении псевдомонад и фекального стрептококка.

Получены эти антибиотики за счет полного синтеза или сложной цепью реакций, используя в качестве начального соединения пенициллин.

На схеме 51 представлена зависимость структуры и функций в группе оксацефемов.

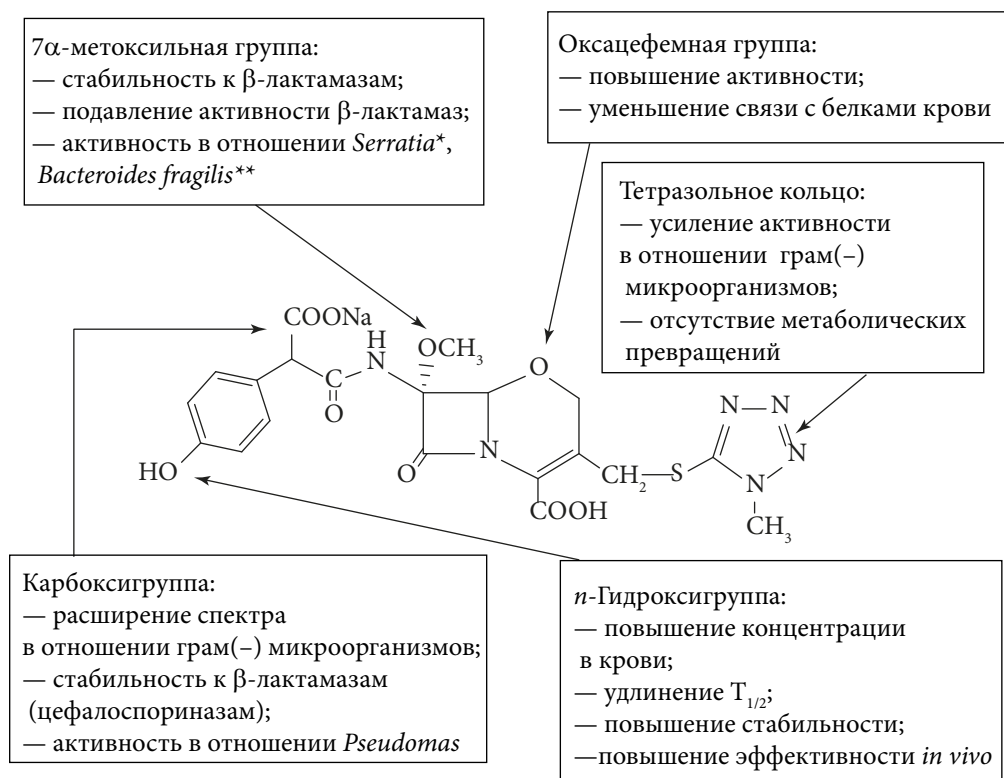


Схема 51. Зависимость структуры и функций в группе оксацефемов

6.2.3. Связь химической структуры и биологического действия цефалоспоринов и цефамицинов

Первичной оценкой связи химического строения и антибиотической активности служит МИК — минимальная ингибирующая концентрация, выраженная в мкг/мл. В отличие от природных пенициллинов природный цефалоспорин С имеет очень низкую антибактериальную активность. Однако структурная модификация радикально улучшает фармакологические свойства соединения.

Практически все аналоги цефалоспорина, проявляющие биологическую активность, имеют 6R- и 7R-конфигурацию соответствующих углеродных атомов.

Исходя из анализа исследования биологической активности неприродных пенициллинов (схема 52), были сделаны выводы:

* *Serratia* — семейство *Enterobacter* (входят сальмонеллы, шигеллы, вибрионы) — модель кишечной микрофлоры, факультативные анаэробы.

** *Bacteroides fragilis* — строгие анаэробы (как модель анаэробных бактерий). Есть патогенные.

1. Бициклическая система цефалоспорины необходима для проявления активности, но в ней возможна замена атома серы на кислород и метиленовую группу без значительной потери активности (оксацефемы, карбацефемы).

2. Положение С-7 цефема является ключевым с точки зрения создания новых лекарственных препаратов. Так же, как и в случае пенициллинов, структурная модификация *N*-ацильного фрагмента в 7-β-положении цефема является наиболее радикальным способом воздействия на антибактериальные свойства антибиотика. Например, введение в С-7-положение цефема заместителя на основе 2-(*N*-защищенной-2-аминотиазол-4-ил)-2(*Z*)-метоксиимино)уксусной кислоты привело к созданию цефалоспоринов 3-го поколения АТМО-цефалоспоринов с расширенным спектром антибактериальной активности и проявляющих более высокую, по сравнению с цефалоспорины 2-го поколения, активность в отношении грамотрицательных бактерий (например, цефотаксим,

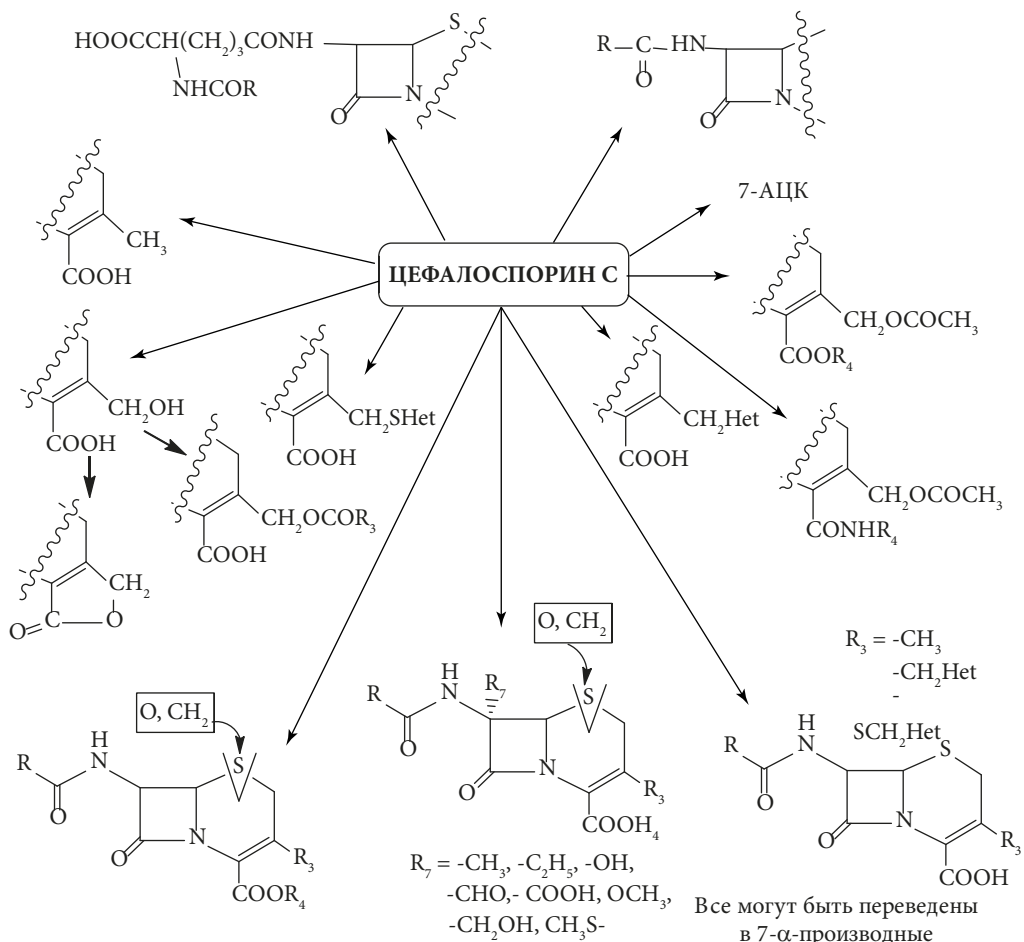


Схема 52. Связь химической структуры и биологического действия цефалоспоринов и цефамицинов

цефтазидим). Введение метокси- и *N*-формиламиногруппы в 7- α -положение цефема придает соединениям устойчивость к β -лактамазам.

3. Модификации цефемного ядра цефалоспорины.

3.1. Структурная модификация в С-3-положении цефема является одним из основных способов воздействия на антибактериальные свойства антибиотика. Заместитель в С-3-положении оказывает также существенное влияние на фармакокинетические свойства соединения. Так, дезацетоксицефалоспорины (цефалексин, цефрадин, цефрадокси́л) имеют только 1/2 активности цефалоглицина, однако они более стабильны в кровяном русле (в 20 раз), медленнее выводятся, лучше всасываются из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

Эффективной модификацией оказалась замена в АТМО-цефалоспори́нах ацетоксиметиленовой группы в положении С-3 на различные азот- и серусодержащие гетероциклические системы. Особенно эффективным оказалось введение в С-3-положение АТМО-цефалоспори́нов гетероциклических заместителей с четвертичным аммонийным азотом. Такая структура заместителя облегчает транспорт соединения через пориновые каналы наружной мембраны грамотрицательных бактерий, что увеличивает их активность. Чрезвычайно эффективными оказались полярные аминотиазодилметоксиминоцефалоспорины цефтазидим — цефалоспорин III поколения и цефалоспорин IV поколения — цефепим.

Повышение антипсевдомонадной активности за счет улучшения клеточной проницаемости было достигнуто путем введения заместителя (4-карбомил-1-хинуклидин) в С-3-положение иминоцефалоспори́нов. Одним из примеров такой модификации является антибиотик *цефклидин* (схема 53).

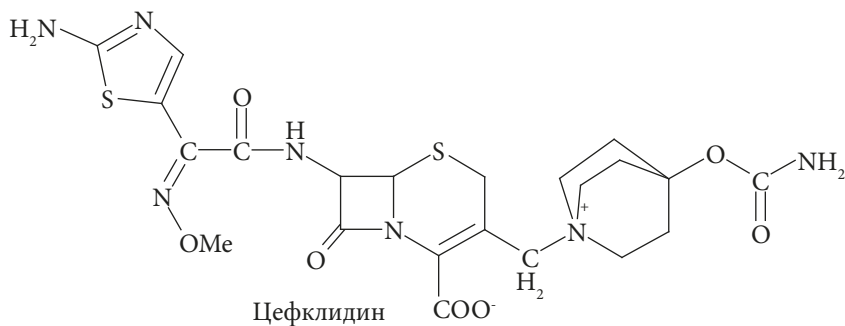


Схема 53. Строение цефклидина

3.2. Введение сложноэфирной защиты карбоксильной группы в С-4-положение цефема, отщепляемой неспецифическими эстеразами сыворотки крови, позволяет получать *процефалоспорины*. Это так же, как в случае пропенициллинов, существенно улучшает фармакокинетические характеристики препаратов (увеличивает липофильность соединения).

3.3. Введение заместителей в С-6-положение цефема приводит к полной потере антибактериальных свойств цефалоспоринов.

4. Одновременная модификация по С-7, С-3 и S-1 дигидротиазинового кольца.

S-Оксиды аминотиазолилметоксииминоцефалоспоринов (АТМО) имеют большую стабильность к β -лактазам грамотрицательных бактерий и проявляют значительную антибактериальную активность (МПК < 1 мкг/мл).

Как обобщение всех известных данных о влиянии заместителей на проявление биологической активности цефалоспоринов была предложена схема 54.

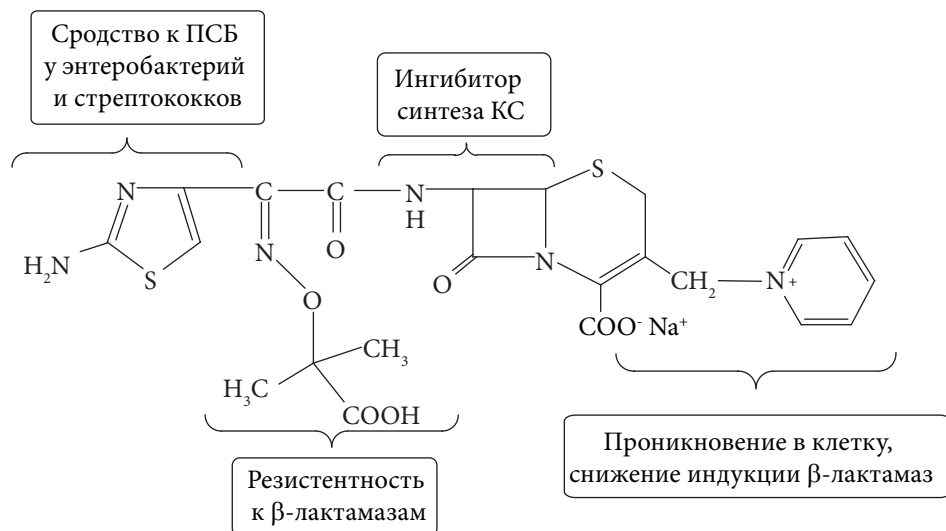


Схема 54. Взаимоотношения структуры и функции в группе цефалоспоринов

Обширный литературный материал по механизмам действия β -лактамов антибиотиков и механизмам антибиотикорезистентности позволил провести систематизацию сведений, касающихся взаимосвязи структуры и биологической активности антибиотиков. Изучение зависимости активности от структурных особенностей β -лактамов антибиотиков позволяет сформулировать основные признаки конструирования новых β -лактамов и создать методологию их поиска. Поиск новых цефалоспоринов и цефамицинов ведется интенсивно, однако задачи поиска новых соединений сузились, так как большое количество цефалоспоринов широкого спектра действия уже применяется, и скрининг ведется целенаправленно:

- получение цефалоспоринов, активных в отношении возбудителей инфекций, резистентных к другим антибиотикам, в частности резистентных стафилококков;
- повышение активности в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая псевдомонады;

- повышение активности в отношении анаэробных бактерий и стабильности к гидролитическому воздействию бактериальных β -лактамаз;
- синтез цефалоспоринов, способных хорошо всасываться из желудочно-кишечного тракта и сохранять активность в желудочном соке (т. е. цефалоспоринов для приема *per os*);
- улучшение фармакокинетических характеристик: длительное сохранение в крови при бактерицидном действии, что обеспечивает терапевтический эффект при однократном введении.

Медико-биологическая ценность вновь синтезированных соединений оценивается по спектру действия или силе действия (по сравнению с имеющимися соединениями), повышенной устойчивости к β -лактамазам или улучшенным фармакокинетическим свойствам. Еще более жесткий отбор касается препаратов, рекомендуемых для промышленного производства, поскольку в этом случае оценивается доступность исходных веществ, технологичность и экономическая целесообразность.

6.3. Ингибиторы β -лактамаз

β -Лактамные антибиотики являются одними из основных препаратов при лечении инфекций, вызванных грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами. Однако их эффективность ограничена широким распространением устойчивых штаммов. Известно четыре механизма резистентности бактерий к β -лактамным антибиотикам:

- снижение проницаемости внешней мембраны у грамотрицательных бактерий (потеря поринов);
- изменение структуры мишени действия антибиотиков (пенициллин-связывающих белков — ПСБ);
- активный транспорт антибиотика из клетки (выброс);
- продукция ферментов, разрушающих эти препараты — β -лактамаз.

Последний механизм наиболее распространенный и действенный. β -Лактамаза (пенициллин-амидо-бета-лактам-гидролаза) Е.с.3.5.2.6 катализирует гидролиз амидной связи в β -лактамном кольце пенициллинов, цефалоспоринов, а также монобактамов и карбапенемов.

Способность микроорганизмов к образованию лактамаз может быть природной, т. е. кодируемой хромосомами, и приобретенной, т. е. передаваемой плазмидами. Хромосомные β -лактамазные гены обнаружены практически у всех групп патогенных бактерий, однако конститутивно β -лактамазы у них продуцируются на низком уровне. Ряд бактерий имеет индуцибельные

β -лактамазы, синтез которых в присутствии индукторов многократно ускоряется. Индукторами часто выступают антибиотики.

Гораздо большее распространение имеют β -лактамазы, кодируемые плазмидами. Плазмиды, несущие гены устойчивости к лекарственным препаратам, в том числе β -лактамазные гены (R-факторы), обнаружены практически у всех групп патогенных бактерий. Плазмидные гены легко передаются от одних бактериальных клеток к другим, и лекарственная устойчивость быстро распространяется в микробных популяциях.

В ряде случаев имеет место перенос хромосомных β -лактамазных генов в плазмиды с их последующим распространением среди бактерий других видов.

Способность продуцировать β -лактамазы может видоизменяться в зависимости от времени и географического региона, при этом один вид микроорганизма может стать источником нескольких разновидностей этого фермента.

В соответствии с их *субстратным* профилем β -лактамазы делятся на три большие группы:

- пенициллин- β -лактамазы;
- цефалоспорин- β -лактамазы;
- цефуроксим- β -лактамазы.

Пенициллин- и цефалоспорин- β -лактамазы вырабатываются большой группой грам(-) бактерий: *E. coli*, *Enterobacter*, *Proteus rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa*. Они гидролизуют пенициллины и цефалоспорины 1-го поколения, а цефалоспорины 2-го и в большей степени 3-го поколения, а также уреидопенициллины к их действию устойчивы.

К группе цефуроксим- β -лактамаз относятся лактамазы, вырабатываемые такими микроорганизмами, как *Proteus morganii*, *Pseudomonas cepacia*, *Bacteroides fragilis*. Эти лактамазы разрушают цефалоспорины 3-го поколения. Они характеризуются наиболее широким спектром действия.

β -Лактамазы относятся к сериновым протеазам с М. м. 20–40 кДа. При связывании с субстратом конформация β -лактамазы меняется на более компактную. В результате взаимодействия гидроксильной группы серина с карбонильной группой β -лактамного кольца происходит разрыв этого кольца и образование ацилфермента (схема 55). Далее ацилфермент гидролизует, и продукт расщепления β -лактамного антибиотика, относящийся к пенициллиновым или цефалоспориновым кислотам, освобождается из комплекса с ферментом (схема 55).

Эффективность гидролиза различных субстратов β -лактамазами зависит от того, насколько точно конформация активного центра фермента может соответствовать форме молекулы субстрата.

Преодолеть резистентность микроорганизмов, обусловленную продукцией β -лактамаз, возможно либо путем синтеза новых соединений, устойчивых

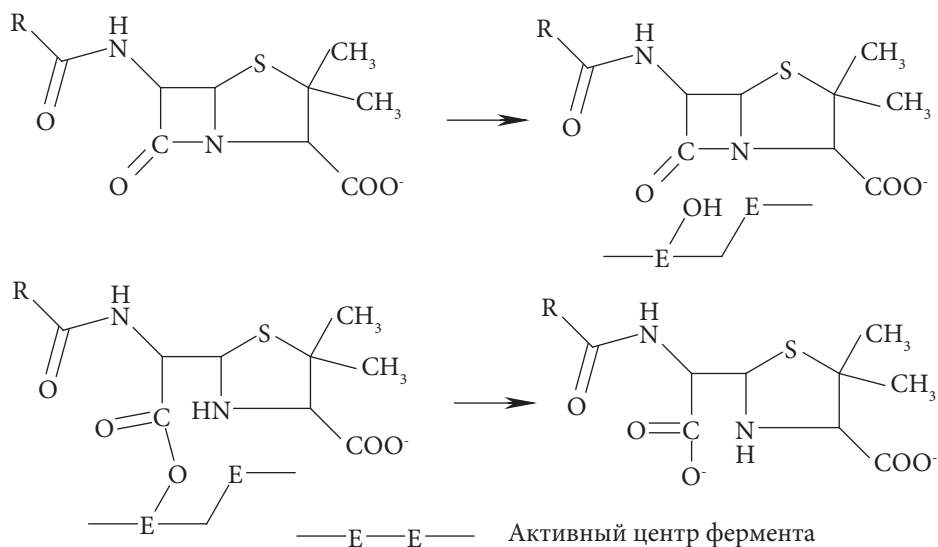


Схема 55. Схема гидролиза пенициллинов β -лактамазами

к гидролизу ферментами, либо путем создания комбинированных препаратов, в состав которых входят антибиотик и ингибитор β -лактамаз.

Раскрытие механизма разрушения β -лактамных антибиотиков и роли β -лактамаз в этом процессе легло в основу поиска веществ, подавляющих активность этих ферментов и защищающих антибиотики от их воздействия.

6.3.1. Требования к потенциальным ингибиторам β -лактамаз

Потенциальные ингибиторы β -лактамаз должны:

- 1) быть активными ингибиторами широкого круга β -лактамаз грамположительных и грамотрицательных, аэробных и анаэробных бактерий;
- 2) быть активными при концентрациях, создаваемых в крови;
- 3) по фармакологическим и фармакокинетическим свойствам соответствовать антибиотикам, в паре с которыми они назначаются;
- 4) характеризоваться низкой токсичностью.

Широкая программа поиска ингибиторов β -лактамаз привела к выделению таких веществ, относящихся к различным классам химических соединений. Наибольший интерес среди них представляют природные или полусинтетические препараты β -лактамной структуры. Среди них можно выделить две группы:

1. Бета-лактамазостабильные пенициллины и цефалоспорины.
2. Специфические ингибиторы, такие как *клавулановая кислота*, *сульбактамы* (производные пенициллановой кислоты), *карбапенемы*.

Однако последние обладают одновременно сильным антибиотическим действием и как ингибиторы не применяются.

6.3.2. β -Лактамазостабильные пенициллины и цефалоспорины

Наиболее распространенным механизмом действия лактамазостабильных пенициллинов и цефалоспоринов является конкурентное ингибирование. Конкурентный ингибитор связывается с активным центром фермента и таким образом препятствует связыванию фермента с субстратом. В качестве конкурентных ингибиторов применяются изоксазолилпенициллины (оксациллин, клоксациллин), которые с очень малой скоростью гидролизуются β -лактамазами. Эти ингибиторы сами обладают существенной антибактериальной активностью, что увеличивает эффективность их применения вместе с лактамазочувствительными антибиотиками. Так, клоксациллин является эффективным конкурентным ингибитором подавляющего большинства хромосомных цефалоспоринов, а также некоторых β -лактамаз широкого спектра действия.

Промышленность выпускает комбинированный препарат *ампиокс* (ампициллин + оксациллин, 1 : 1), обладающий широким спектром антибактериального действия. Благодаря присутствию оксациллина, он активен в отношении пенициллиназообразующих стафилококков.

В качестве конкурентных ингибиторов β -лактамаз могут выступать и другие антибиотики, слабо гидролизуемые этими ферментами (цефокситин, цефалоспорины 3-го поколения).

Однако ингибирующие свойства β -лактамазоустойчивых пенициллинов и цефалоспоринов проявляются при их высокой концентрации и распространяются на небольшое число β -лактамаз.

6.3.3. Специфические ингибиторы

В 70-е гг. XX в. были получены многочисленные специфические ингибиторы, многие из которых лишены антибактериальной активности.

Наибольшее применение в клинической практике нашли ингибиторы, имеющие β -лактамную структуру. По механизму действия они являются суицидными инактиваторами — расщепляются при взаимодействии с ферментом. Продукты их распада, имеющие высокоактивные группы, образуют ковалентные связи с активным центром фермента и таким образом инактивируют его.

Клавулановая кислота. Данная кислота выделена в 1976 г. при ферментации продуцента *Streptomyces clavuligerus*. Гетероциклический скелет — клавам или оксапенам (схема 56).

Клавулановая кислота обладает лишь слабой антибактериальной активностью, как антибиотик практического значения не имеет. Она является наиболее универсальной из ингибиторов β -лактамной природы, эффективно ингибирует большинство пенициллиназ и β -лактамаз широкого спектра действия, имеющих широкое распространение в клинике. Не действует на лактамазы, кодируемые хромосомой.

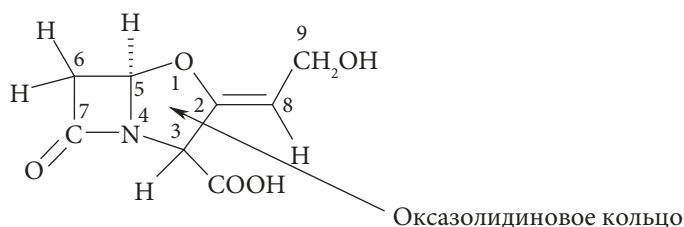


Схема 56. Клавулановая кислота

Клавулановая кислота усиливает действие многих пенициллинов и цефалоспоринов. В клинике ее используют в сочетании с амоксициллином или ампициллином (препараты аугментин и амоксиклав) и рядом других пенициллинов и цефалоспоринов.

Получен ряд производных клавулановой кислоты и изучен их ингибирующий эффект. 1-Тиоаналог клавулановой кислоты и ее производные с гидрированной экзоциклической двойной связью обладают менее выраженными ингибирующими свойствами, чем природное соединение.

Превращение карбоксильной группы в метиловый или бензиловый эфиры не изменяет биологических свойств соединения. Аналогичный эффект наблюдается при декарбоксилировании клавулановой кислоты.

Наиболее эффективным способом улучшения ингибирующего действия клавулановой кислоты является модификация заместителей в С-9-положении клавама. Замена гидроксильной группы на amino-, дибензиламино-, фенил-, *N*-формиламино-группы приводит к значительному усилению ингибирующих свойств производных.

Производные пенициллановой кислоты. Ингибиторы β -лактамаз этой группы, найденные среди сульфоксидов и сульфонов пенициллановой кислоты, объединены в группу *сульбактамов*. Строение сульбактамов приведено на схеме 57. Для улучшения всасывания при введении внутрь получен эфир сульбактама (его пивамоилоксиметильное производное; схема 57).

На основе сульбактама созданы фиксированные комбинации с ампициллином и мециллинамом в соотношении 1 : 1. Сульбактам и его производные

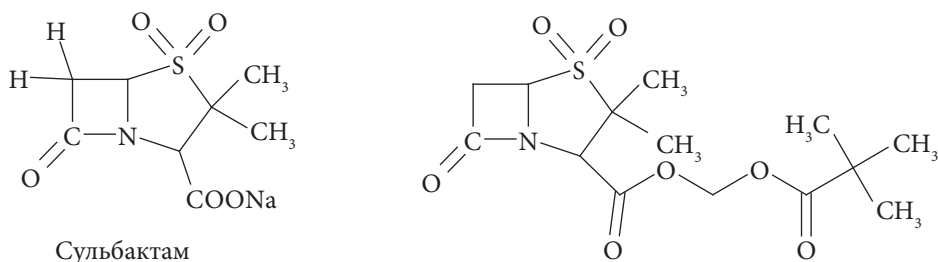


Схема 57. Сульбактам и его пивамоилоксиметильное производное

так же, как клавулановая кислота, являются эффективными суицидальными инактиваторами многих лактамаз широкого спектра действия, некоторых цефалоспоринов, пенициллиназ. Антибактериальный спектр сульбактама ограничен и включает только некоторые виды нейссерий (возбудители гонореи), бактероидов, псевдомонад (1-й вид).

Сульбактам усиливает антибактериальную активность бензилпенициллина, пенициллинов широкого спектра действия, цефалоспоринов.

Фирмой Pfizer разработан комбинированный β -лактамный препарат ампициллин/сульбактам в соотношении 2 : 1 с торговым названием *уназин*. Препарат создан на основании близости фармакокинетических и физико-химических свойств обоих компонентов, что обеспечивает достижение оптимальных концентраций в крови и тканях. Препарат отличается хорошей переносимостью, у микроорганизмов отсутствует развитие устойчивости к нему.

Присутствие в этом комбинированном препарате сульбактама восстанавливает антибактериальную активность ампициллина в отношении устойчивых к его действию микроорганизмов.

Так, в настоящее время среди грамотрицательных патогенов, традиционно чувствительных к ампициллину (*E. coli*, *P. mirabilis*), обнаружено лишь 50 % чувствительных штаммов. Добавление к ампициллину сульбактама повышает уровень его активности на 21 %.

Применяется только парентерально. Разработано также средство для приема внутрь — *сультамицин* (*unasin oral*; схема 58).

Цефалоспорины 3-го поколения оказались сходными по биологической активности: цефоперазон, цефотаксим и цефтриаксон — 71 % чувствительных штаммов, цефтазидим — 81 %. Комбинация цефоперазон/сульбактам оказалась на 16 % активнее цефоперазона, цефотаксима, цефтриаксона и на 5 % активнее цефтазидима — 86,1 % чувствительных штаммов и по этому показателю приближалась к *имипенему* (карбапенем, о котором речь пойдет в разд. 6.4.1) — 89,6 % чувствительных штаммов.

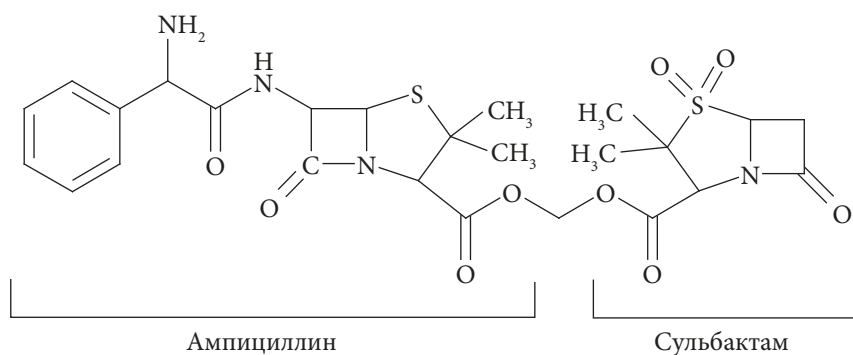


Схема 58. Препарат сультамицин

Преимущество комбинации — способность сульбактама ингибировать β -лактамазы широкого спектра действия.

Создание комбинированных препаратов на основе ингибиторов β -лактамаз и известных, давно применяемых в медицине пенициллинов и цефалоспоринов (ампициллин, амоксициллин и др.) является новым и плодотворным направлением, разрабатываемым фармацевтическими фирмами США, Англии, России, и в настоящее время рассматривается как путь, альтернативный созданию препаратов, устойчивых к действию этих ферментов.

6.4. Карбапенемные, пенемные и моноциклические β -лактамные антибиотики — нетрадиционные β -лактамы

В дополнение к традиционным пенициллинам и цефалоспорином со второй половины 70-х гг. XX в. началась активная разработка новых β -лактамных антибиотиков, относящихся к карбапенемам, пенемам и монобактамам (моноциклическим β -лактамидам).

6.4.1. Карбапенемы

Карбапенемы представляют собой 1-карбапен-2-ем-3-карбоновые кислоты, замещенные в положении C-2 и C-6 (схема 59). Некоторые из этих соединений (их более 20) обладают выраженной антибактериальной активностью и устойчивы к действию β -лактамаз.

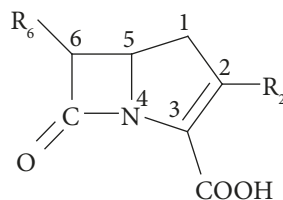


Схема 59. Общая формула карбапенемов

Отличие карбапенемных антибиотиков от других β -лактамов — наличие в положении C-6 гидроксиэтильной боковой цепи и отсутствие ациламидной. Для повышения устойчивости к β -лактамазам в карбапенемах необходима *транс*-конфигурация боковой цепи. Во всех других β -лактамах для обеспечения устойчивости к действию β -лактамаз требуется *цис*-расположение боковой цепи молекулы.

Тиенамицин. Первым антибиотиком группы карбапенемов, выделенном при культивировании *Streptomyces catteleya* был *тиенамицин* (схема 60). Антибиотик широкого спектра действия, он был чрезвычайно нестабилен и не нашел применения.

Наибольшее применение нашло его *N*-формимидоильное производное — *имипенем* (см. схему 60). Введение амидиновой группы приводит к повышению кислотостойкости, увеличению устойчивости к действию большинства

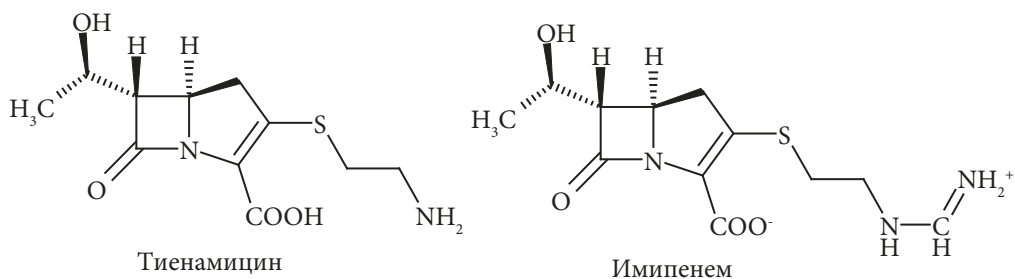


Схема 60. Формула тиенамицина и имипенема

β -лактамаз (более чем в несколько тысяч раз по сравнению с пенициллином). Сверх того, имипенем является эффективным ингибитором ряда β -лактамаз.

Благодаря своей цвиттер-ионной структуре, препарат хорошо диффундирует через пориновые каналы грамотрицательных бактерий и вызывает гибель микроорганизма значительно быстрее, чем другие β -лактамные антибиотики.

Этот препарат сочетает высокую антибактериальную активность с исключительно широким спектром действия, распространяющимся практически на все возбудители бактериальных инфекций (подавляет 90 % грамположительных бактерий в концентрации менее 1 мкг/мл, более 97 % энтеробактерий при МИК менее или равной 4 мкг/мл). Существенное значение имеет высокая активность имипенема в отношении иерсиний (возбудителей чумы) и листерий (менингоэнцефалит), а также анаэробов. Значение МИК антибиотика для большинства штаммов грамположительных и грамотрицательных анаэробов колеблется в пределах 0,004-0,125 мкг/мл. К концентрации имипенема 4 мкг/мл чувствительны все штаммы анаэробов. Высокая активность, видимо, является результатом высокой реакционной способности амидной связи β -лактамного кольца с напряженной бициклической структурой.

Имипенем является антибиотиком первого выбора в тяжелых случаях для пациентов, поступивших в клинику в коллапсе, шоке, с высокой температурой, поскольку спектр его действия достаточно широк.

Как имипенем, так и другие карбапенемы быстро метаболизируют в почечной ткани в присутствии дегидропептидазы I, что приводит к резкому снижению концентрации антибиотика в мочевом тракте и снижает эффективность его действия. Для снижения уровня ферментативного расщепления применяют специфический ингибитор дегидропептидазы — *циластатин* (ферментной природы). Циластатин не обладает бактериальной активностью. Комбинированный препарат на основе имипенема и циластатина (1 : 1) выпускается под названием *тиенам*.

В качестве альтернативы способу защиты карбапенемов с использованием ингибиторов ферментативной природы получены производные, устойчивые

к действию почечной дегидропептидазы. Это карбапенемы, имеющие в положении С-2 замещенные четвертичные гетероциклические и аминоалкилтиогруппы: фрозен, пирролидинтиокарбапенем, меропенем.

В клинике нашел применение *меропенем* (схема 61). Наличие в молекуле меропенема метильной группы в положении С-1 β -карбапенемного цикла приводит к стабилизации антибиотика по отношению к действию дегидропептидазы I.

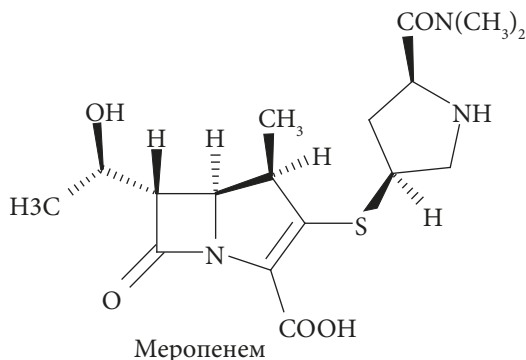


Схема 61. Строение меропенема

В целом меропенем имеет несколько меньшую, чем имипенем, активность в отношении грамположительных бактерий и значительно бóльшую активность (в 2-64 раза выше) в отношении некоторых грамотрицательных бактерий. Препарат характеризуется высокой терапевтической активностью и устойчивостью к действию различных β -лактамаз.

6.4.2. Пенемы

Пенемы в природе не встречаются. Они были созданы как «ядерный гибрид» объединением в одной молекуле структурных элементов, важных для химической реакционной способности и биологической активности, как пенициллинов, так и цефалоспоринов: напряженный амидный резонанс, вытекающий из неплоской структуры пенициллинов и конкурирующий енаминный резонанс, возникающий в цефалоспорилах (схема 62).

Соединения характеризуются высокой устойчивостью к действию наиболее распространенных β -лактамаз. Синтез сложен, многостадийен и осложняется необходимостью создавать определенную стереохимию хиральных С-атомов, необходимую для проявления биологической активности. В медицине пенемы пока не применяются.

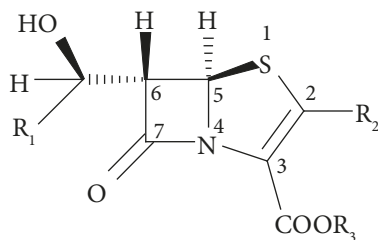


Схема 62. Общая формула карбапенемов

6.4.3. Моноциклические β -лактамные антибиотики

Моноциклические β -лактамные антибиотики — это относительно малочисленное семейство β -лактамных антибиотиков (схема 63).

Отличительной особенностью моноциклических β -лактамов является наличие изолированного β -лактамного кольца, *цис*-ациламиногруппы в положении С-3 и объемного заместителя по N-1 кольца.

Открытие моноциклических β -лактамидов опровергло мнение о невозможности проявления антибактериальных свойств изолированным β -лактамным циклом без «поддержки» конденсированной с ним гетероциклической или карбоциклической системы.

Моноциклические β -лактамиды подразделяются на несколько групп: *нокардицины*, *монобактамы*, *моносульфактамы*, *монофосфамы*, *оксамазины*.

Среди моноциклических β -лактамных антибиотиков семейство *монобактамов* наиболее перспективно с точки зрения возможности медицинского применения. Отличительная их особенность — наличие в молекуле *сульфаматной группировки*, редко встречающейся у природных соединений (схема 64).

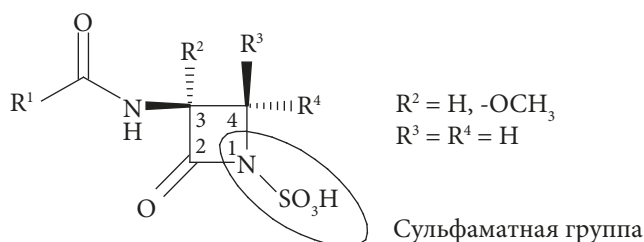


Схема 64. Общая формула монобактамов

Монобактамы — единственное семейство β -лактамных антибиотиков, образуемых бактериями. Продуценты *Glucanobacter oxydans*, *Acetobacter oxydans* продуцируют антибиотик в поздней логарифмической фазе, *Chromobacterium violaceum* — в логарифмической фазе роста, *Agrobacterium radiobacter* — в стационарной фазе. Особенность репродукции — кислая среда, не развиваются на средах со щелочным значением pH. Для биосинтеза монобактамов потребляются серин, глицин, цистеин.

Описано 10 природных монобактамов, у которых R_2 либо H, либо OCH_3 , а R_1 — разнообразные ацилы.

Природные монобактамы обладают сравнительно низкой антимикробной активностью (МИК 6–25 мкг/мл), причем преимущественно или избирательно подавляют грамотрицательные микроорганизмы. Наиболее ценное биологическое свойство представителей этого семейства — их стабильность по отношению к β -лактамазам. Как общая закономерность — более низкая активность и более высокая устойчивость к β -лактамазам у монобактамов с метоксигруппой у С-3 в молекуле по сравнению с активностью и стабильностью аналогов, не содержащих этой группировки.

Относительная простота молекул монобактамов делает предпочтительным использование синтетических методов перед трансформацией природной молекулы.

Основой для получения разнообразных соединений этого семейства является 3-аминомонобактамовая кислота (3-АБК), которая может быть получена гидролизом природных монобактамов, но целесообразнее ее синтез исходя из L-серина и его аналогов или 6-АПК.

Ацилирующий радикал выбирался по аналогии с хорошо изученными пенициллинами и цефалоспоринами: синтезированы производные с уреидоацетил-, оксииминоацетил- и метоксииминоацетил-радикалами.

Наибольший интерес представляет азтреонам (азактам).

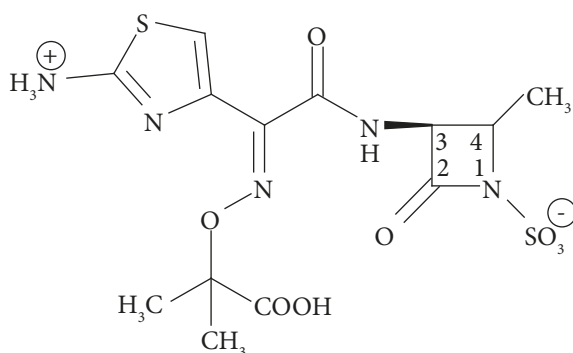


Схема 65. Строение азтреонама

Основной особенностью азтреонама является его уникальный спектр антимикробного действия: антибиотик высокоактивен (МИК < 1 мкг/мл) в отношении аэробных грамотрицательных бактерий, включая *Pseudomonas spp.*, но не активен в отношении грамположительных и анаэробных грамотрицательных бактерий. Он обладает высокой стабильностью по отношению к широкому кругу β -лактамаз (плазмидных и хромосомных). Это свойство азтреонама объясняется его высоким сродством к ПСБ грамотрицательных бактерий и слабым — к остальным белкам-мишеням, включая ПСБ *S. aureus*.

Высокая стабильность азтреонама по отношению к β -лактамазам грамотрицательных бактерий приводит к тому, что он подавляет многие штаммы микроорганизмов, устойчивые к цефалоспорином 3-го поколения. Азтреонам имеет хорошие терапевтические свойства, хорошо переносится, мало токсичен.

Показания к применению: пиелонефрит, цистит, уретрит, простатит, пневмония, эмпиема, плеврит, менингит, сепсис, инфекции костей, суставов, кожи, мягких тканей, перитонит, заболевания органов брюшной полости и малого таза, послеоперационные инфекции, гонорея.

Второй активный монобактам — карумонам (схема 66).

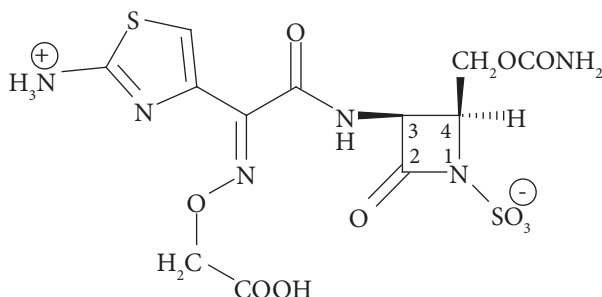


Схема 66. Строение карумонама

Он также обладает широким спектром антибактериального действия в отношении грамотрицательных микроорганизмов, особенно выражена противосинежничная активность. Карумонам устойчив к действию большинства плазмидных и хромосомных β -лактамаз, гидролизующих азтреонам и цефалоспорины 3-го поколения, продуцируемые клебсиеллами, бактероидами и протейями.

Взаимосвязь химического строения и биологического действия моноциклических β -лактамидов

Молекулы моноциклических β -лактамных антибиотиков достаточно просты, что позволяет оценить вклад каждого из возможных заместителей при N-1, C-3(α), C-3(β) и C-4 в проявлении антимикробной активности веществ. Наиболее важное значение имеют N-1 заместитель и N-ацилирующая цепь при C-3.

Основная роль кислотного электроноотрицательного заместителя в положении N-1 (чаще всего $-SO_3H$) у амидного азота монобактама сводится к ослаблению ациламидной связи в β -лактамном кольце, чрезвычайно стабильной в неактивном N-незамещенном азетидиноне-2. Замена сульфаматной группы на другие электроноакцепторные заместители не приводит к существенному изменению антибактериальной активности.

Модификация N-ацильного фрагмента в положении C-3(β) монобактама (3S-конфигурация), как и в случае пенициллинов и цефалоспоринов, является

наиболее эффективным способом воздействия на антибактериальные свойства производных. Наиболее активными оказались монобактамы, *N*-ацильный фрагмент которых заимствован у цефалоспоринов 3- и 4-го поколений. Аналоги пиперациллина и цефбуперазона обладают широким спектром действия и высокой антимикробной активностью.

Производные с АТМО группировкой обладают широким спектром действия и высокой антимикробной активностью.

Стереоизомерные производные, имеющие противоположную конфигурацию (3*R*), не активны.

Введение OCH_3 и NHCHO групп в 3- α -положение приводит к повышению устойчивости антибиотиков к β -лактамазам широкого круга так же, как и в случае пенициллинов (6*a*) и цефалоспоринов (7*a*). Кроме того, метоксилированные монобактамы являются ингибиторами карбоксипептидазы.

Введение CH_3 и $\text{CH}_2\text{OCONH}_2$ (карбомоилоксиметил) групп в С-4-положение монобактама повышает резистентность производных к β -лактамазам, что расширяет спектр их действия и повышает активность по сравнению с неметилованными аналогами. Увеличение размера заместителя параллельно с повышением устойчивости к β -лактамазам снижает антибактериальную активность антибиотика.

Моноциклические β -лактамы — одно из самых молодых семейств антимикробных веществ. Их интересные биологические свойства — широкий спектр антимикробного действия, стабильность к β -лактамазам — позволяют надеяться на дальнейший прогресс в их исследовании, в частности, на синтез с учетом влияния заместителей новых представителей этого семейства, который продолжается с возрастающей интенсивностью, и серьезное физико-химическое и биологическое изучение их свойств.

Из монобактамных антибиотиков медицинское применение нашли *азтреонам* и *карумонам* (у последнего — более высокая стабильность по отношению к β -лактамазам грамотрицательных бактерий и более выраженные противонаэробные свойства).

6.5. Антибиотики аминогликозиды

После внедрения в клиническую практику пенициллина во всем мире усилились целенаправленные поиски других антибиотиков, которые дополнили бы антимикробный спектр пенициллинов, активных только против грамположительных бактерий.

Таким антибиотиком стал открытый вслед за пенициллином *стрептомицин*, который по химическому строению принадлежит к антибиотикам-

аминогликозидам, образуемым некоторыми штаммами родов *Streptomyces*, *Micromonospora* и *Bacillus*.

Антибиотики-аминогликозиды получили свое название потому, что в их состав входит *циклический спирт* — агликон, содержащий аминогруппу (его еще называют аминокиклитол), связанный гликозидной связью с одним или несколькими сахарами.

Все они являются производными сахаров по гликозидному гидроксилу, и агликон обязательно содержит аминогруппу.

6.5.1. Природные стрептомицины

К стрептомицинам относится ряд близких по химическому строению и по биологическим свойствам антибиотиков, представляющих большой практический интерес ввиду их значительной антибактериальной активности.

Известно четыре природных стрептомицина. Первый и наиболее важный представитель этой группы — *стрептомицин* — был впервые описан Ваксманом в 1944 г. Продуцент его выделен из ротовой полости цыпленка и унавоженной почвы Северной Америки.

Второй антибиотик этой группы — *маннозидострептомицин* (Str B) был открыт в 1947 г. Фридом, а в 1950 г. обнаружен третий антибиотик — *оксistreптомицин*.

Все эти антибиотики образуются лучистыми грибами — актиномицетами, принадлежащими к роду *Streptomyces*, их виды: *Str. griseus*, *Str. bikiniensis*, *Str. olivaceus*.

В 1957 г. в Японии выделили четвертый природный стрептомицин — *дигидрострептомицин*, образуемый *Actinomyces humidus*.

Особенности химического строения стрептомицинов

При изучении строения стрептомицина первым продуктом его расщепления, изолированным в индивидуальном виде, был мальтол (схема 67).

Это соединение образуется при кратковременном кипячении стрептомицина с водными растворами щелочей. Но мальтол возникает в результате очень

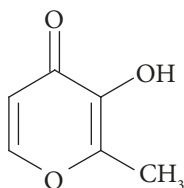


Схема 67. Продукт расщепления стрептомицинов — мальтол

глубоких изменений в молекуле стрептомицина, поэтому его открытие почти ничего не дало в выяснении строения антибиотика. Однако эта реакция используется до сих пор для количественного определения стрептомицина (по мальтолу).

Более существенными для выяснения строения стрептомицина оказались результаты кислотного расщепления стрептомицина.

При гидролизе водными растворами кислот молекула стрептомицина распадается на два вещества — *стрептобиозамин* и *стрептидин* (схема 68).

В 1945–1949 гг. были выяснены структуры этих продуктов, их пространственное строение и связи в молекуле. *Стрептобиозамин* представляет собой своеобразный дисахарид, состоящий из стрептозы и *N*-метил- α -глюкозамина, связанных кислородным атомом. *Стрептидин* оказался пространственным изомером 1,3-дигуанидино-2,4,5,6-тетрагидроксициклогексана.



Схема 68. Продукты кислотного расщепления стрептомицина — стрептобиозамин и стрептидин

Стрептидин представляет собой сильное двухвалентное основание. Основные свойства обусловлены наличием двух остатков гуанидина. Потенциометрическим титрованием установлено, что обе основные группы имеют одинаковый порядок основности.

Эти продукты гидролиза не обладают никакой антибактериальной активностью.

Вскоре после определения строения стрептидина и стрептобиозамина был решен вопрос и о характере связи этих соединений в *стрептомицине*. Оказалось, что стрептидин связан со стрептобиозамином гликозидной связью, образуемой за счет гидроксильной группы, стоящей у С-4 атома стрептидина и С-1 атома стрептозы (схема 69).

Стрептомицин представляет собой сильное трехвалентное основание, основные свойства обусловлены наличием в его молекуле двух остатков гуанидина и одной вторичной аминогруппы. Благодаря этому стрептомицин легко образует соли с кислотами. Хорошо растворим в воде, плохо — в большинстве органических растворителей. Поэтому аминогликозидные антибиотики плохо всасываются при приеме внутрь.

Маннозидострептомицин (Str B; схема 70) образуется теми же штаммами лучистого гриба, который продуцирует стрептомицин. В его молекулу входит

еще *D*-манноза, присоединенная к *N*-метил- α -глюкозаминной части кислотным мостиком, образованным за счет 1-ОН маннозы 4-ОН *N*-метил- α -глюкозамина.

Активность маннозидострептомицина в 3 раза меньше, чем у стрептомицина, поэтому практического значения не имеет. В присутствии фермента маннозидострептомициназа происходит гидролиз на стрептомицин и маннозу. Условия оптимальной деятельности фермента создаются при хорошей аэрации культуральной жидкости.

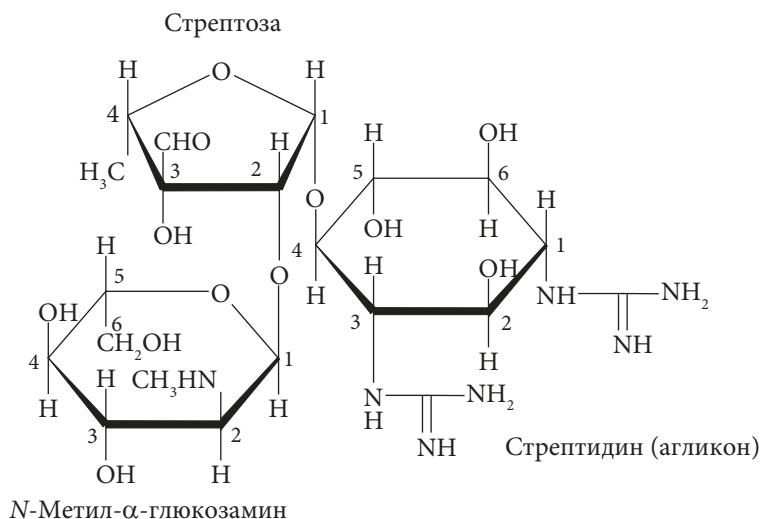


Схема 69. Строение стрептомицина

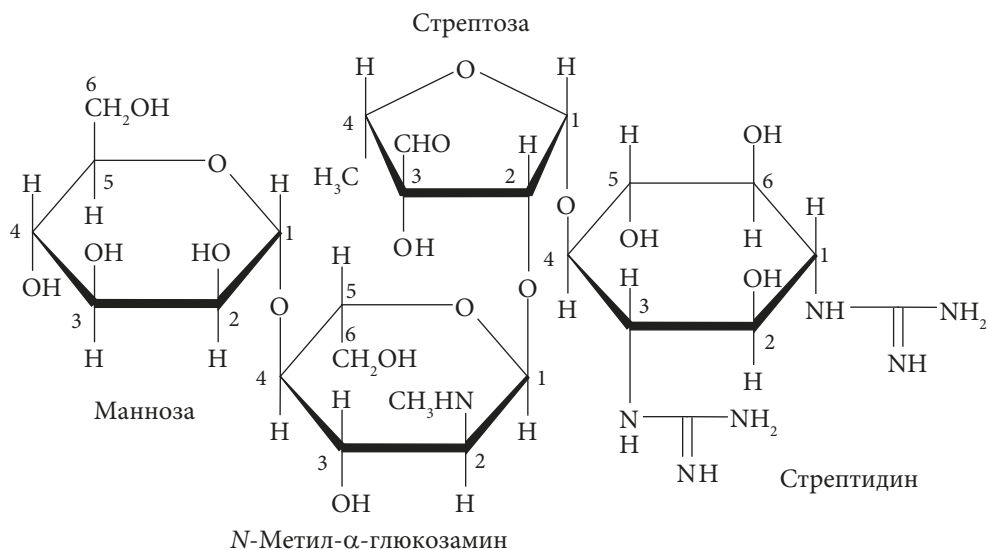


Схема 70. Строение маннозидострептомицина

Оксистрептомицин (схема 71) образуется одним из видов *Streptomyces*. По своим биологическим свойствам новый антибиотик очень сходен со стрептомицином.

Суммарная формула оксистрептомицина отличается от формулы стрептомицина только одним дополнительным кислородом, находящимся в стрептозе.

По своему антибактериальному действию оксистрептомицин очень близок к стрептомицину.

Дигидрострептомицин (схема 72) впервые он был получен как полусинтетический продукт восстановлением стрептомицина $H_2/Pt, Pd, Ni/Re$ или электрохимическим путем. В 1957 г. был выделен в Японии из продуцента *Str. humidus*.

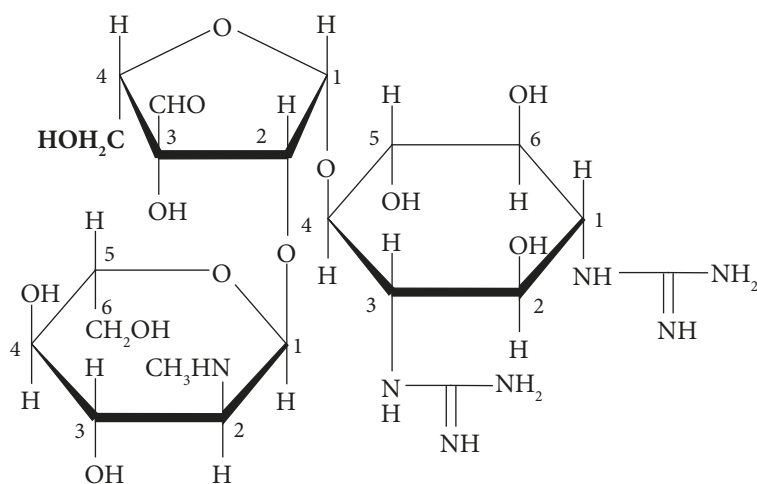


Схема 71. Строение оксистрептомицина

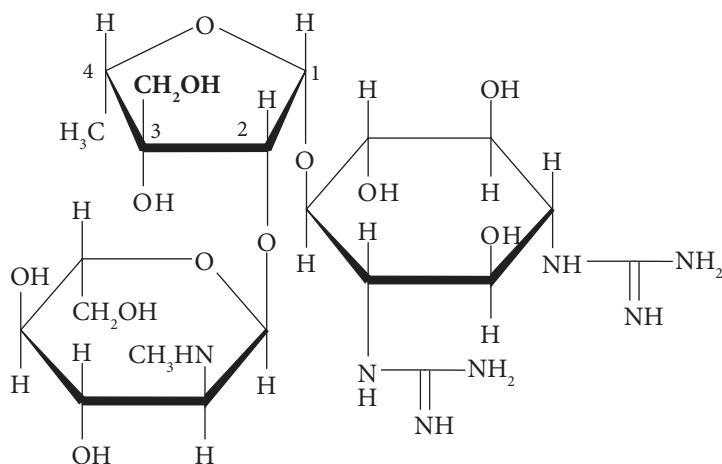


Схема 72. Строение дигидрострептомицина

Он интересен тем, что обладает меньшей токсичностью в отношении вестибулярного аппарата при сохранении активности стрептомицина, но больше поражает слух.

В химическом отношении он отличается от стрептомицина тем, что содержит вместо альдегидной группы в стрептозной части молекулы в положении 3 гидроксиметильную группу.

Установлено, что химически чистый стрептомицин устойчив в сухом состоянии и в виде растворов. Сухие соли при хранении их при комнатной температуре инактивируются лишь в незначительной степени на протяжении нескольких лет. Стабильность растворов солей стрептомицина зависит от чистоты препарата, температуры, pH среды. Максимум стабильности растворов гидрохлорида стрептомицина и сульфата стрептомицина лежит при значении pH в пределах от 3,0 до 7,0 и температуре от 7° до 28 °С.

Антибактериальный спектр стрептомицина значительно шире антибактериального спектра природного пенициллина. Кроме грамположительных бактерий, стрептомицин действует на грамотрицательные кислотостойкие микроорганизмы, а также на риккетсии и некоторые вирусы. Он способен подавлять рост пневмококков, стафилококков (стрептококки не чувствительны), туберкулезной палочки, кишечной палочки, бактерий туляремии, инфлюэнцы, тифозной и дизентерийной палочки, бруцелл и чумной палочки. Особенно эффективным стрептомицин является при лечении туберкулеза и туляремии. В настоящее время это наиболее эффективное из всех известных средств лечения туляремии. Особенно эффективен стрептомицин при туберкулезе верхних дыхательных путей, туберкулезном менингите, а также при лечении инфильтративного туберкулеза легких, туберкулеза кожи. При всех видах туберкулеза наибольший эффект достигается в ранней или острой фазе процесса.

Однако стрептомицин имеет ряд существенных недостатков:

1. У него большая, по сравнению с пенициллином, токсичность, необратимое поражение вестибулярной и слуховой ветвей 8-й пары черепномозговых нервов с частичной или полной двусторонней глухотой, головокружение, шум в ушах, головная боль.

2. Высокая частота аллергических реакций.

3. Низкий терапевтический индекс. Быстрое выведение из организма (уже через 30 мин. после подкожного введения около 35–40 % препарата выводится из организма). Вводят этот препарат несколько раз в сутки.

4. Не способен всасываться из желудочно-кишечного тракта, следовательно, прием *per os* исключается, кроме случаев лечения инфекционных заболеваний ЖКТ (дизентерия и др.).

5. Высокая частота появления устойчивых мутантов и широкое их распространение. Чтобы избежать этого привыкания, или резистентности микробов,

при лечении туберкулеза стрептомицин применяют в сочетании с другими синтетическими противотуберкулезными препаратами: *пара*-аминосалициловой кислотой (ПАСКом) и фтивазидом.

Механизм действия стрептомицинов. Мишенью стрептомицина и других аминогликозидов являются рибосомные белки, а именно белки 30S субчастиц рибосом микроорганизмов. При этом нарушаются их целостность и функции — укрепление на них м-РНК, следствие — нарушение синтеза белка на уровне рибосом — гибель клеток — бактерицидный эффект. Избирательность состоит в том, что макроорганизм (эукариотный) имеет рибосомы с 40S субчастицей.

Причина ото- и нефротоксичности еще не выяснена.

6.5.2. Неприродные стрептомицины

Для устранения недостатков стрептомицина были предприняты попытки синтеза неприродных стрептомицинов.

Цели модификации:

1. Создание препаратов с более высокой антибактериальной активностью.
2. Расширение спектра действия.
3. Снижение токсичности.
4. Увеличение стабильности к инактивирующему действию ферментов, продуцируемых резистентными штаммами.

Для модификации структуры природных стрептомицинов использовались методы направленной ферментации и полусинтеза.

Направленная ферментация. В условиях ингибирования процесса метилирования аминокетогруппы глюкозамина таким ингибитором является бензолсульфохлорид. В результате получается дезметилстрептомицин. Изменение условий культивирования: в условиях сильной аэрации предотвращается биосинтез неактивного маннозидострептомицина.

Полусинтез, или химическое модифицирование, молекулы. Возможность полусинтеза заложена в структуре природного стрептомицина. Обычно объектами модифицирования являются стрептомицин и дигидрострептомицин. Модификации подвергались формильная и метиламиногруппа.

Наибольшее число имеющих практическое значение модификаций — это реакции по формильной группе и реакции образования солей.

По формильной группе наиболее значимыми модификациями являлись электрохимическое восстановление стрептомицина с образованием дигидрострептомицина (схема 73) и синтез гидразонов, например, с гидразидом изоникотиновой кислоты (гидразид ИНК; схема 74).

Стрептогидразид ИНК применяется в виде соли с ПАСК под названием *стрептогидразид-ПАСК* при возникновении резистентных форм микроорганизмов.

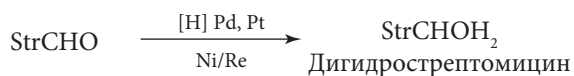


Схема 73. Восстановление стрептомицина с образованием дигидрострептомицина

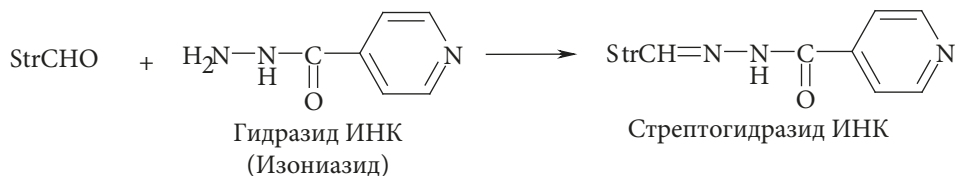


Схема 74. Синтез гидразона с изониазидом

Также получали бисульфитные производные стрептомицина и дигидрострептомицина (схема 75).

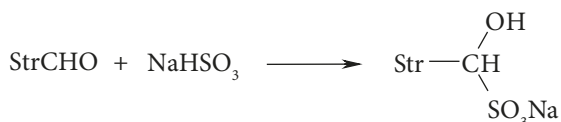


Схема 75. Синтез бисульфитного производного

По основным группам получали соли с соединениями кислого характера. Например, были получены соли с минеральными кислотами: $\text{Str}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{SO}_4$ (хорошо растворима, для инъекций), $\text{Str} \cdot 3\text{HCl}$, $\text{Str} \cdot \text{CaCl}_2 \cdot 3\text{HCl}$ — хлоркальциевый комплекс (хорошо растворим в воде).

Na-Бисульфитное производное стрептомицина в виде сернокислой соли — *стрептосульмицин* — представлено на схеме 76.

Также были получены соли с физиологически активными соединениями. Например, пантотеновокислые соли стрептомицина и дигидрострептомицина, аскорбиновокислая соль стрептомицина, *стрептоциллин* — пенициллин-стрептоциллиновая соль (действует на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы; схема 77).

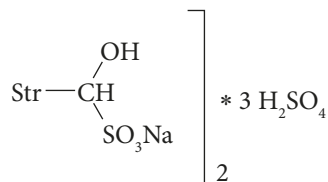


Схема 76. Стрептосульмицин

Получены соли с противотуберкулезными препаратами *пасомицин* и *стрептосалюзид* (схема 78).

Все соединения сохраняют активность стрептомицина, за исключением стрептосалюзида, который активнее в 10–100 раз. Все соединения активны в отношении стрептомицин-устойчивых форм бактерий.

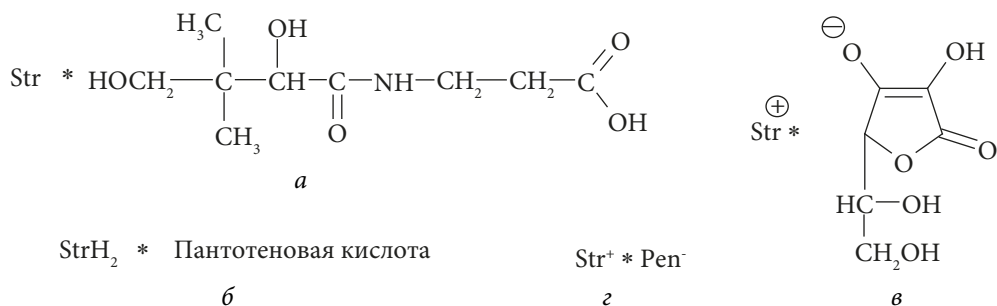


Схема 77. Пантотеновокислые соли стрептомицина (а) и дигидрострептомицина (б), стрептоциллин — пенициллин-стрептоциллиновая соль (в), аскорбиновокислая соль стрептомицина (2)

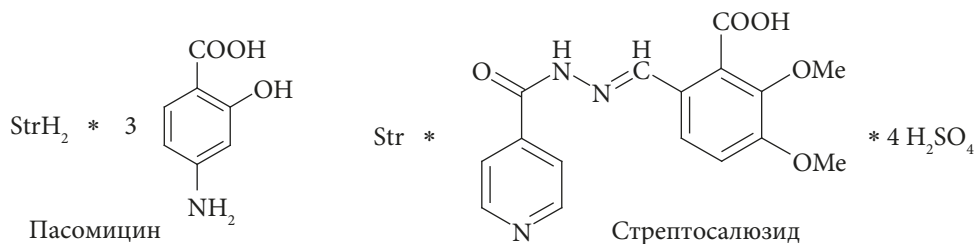


Схема 78. Пасомидин и стрептосалюзид

Введение в состав лекарственной формы физиологически активных соединений (витаминов) уменьшает побочное действие стрептомицина и дигидрострептомицина.

6.5.3. Зависимость антибиотического действия стрептомицинов от их строения

Показано, что ни один из продуктов модифицирования (схема 79) не превосходит природный стрептомицин по активности.

Были выявлены следующие важные моменты зависимости антибиотического действия стрептомицинов от их строения:

1. Каждый из остатков молекулы стрептомицина антибактериальным действием не обладает. Следовательно, биологическая специфичность стрептомицинов определяется одновременным присутствием в их молекуле и стрептидинового, и углеводного остатка.

2. В стрептидиновом остатке обязательно наличие гуанидиновых группировок, так как их удаление приводит к полной потере активности.

3. Углеводные остатки могут подвергаться значительным изменениям без заметного снижения активности соединений. Например:

а) маннозидострептомицин только в 3 раза менее активен, чем стрептомицин;

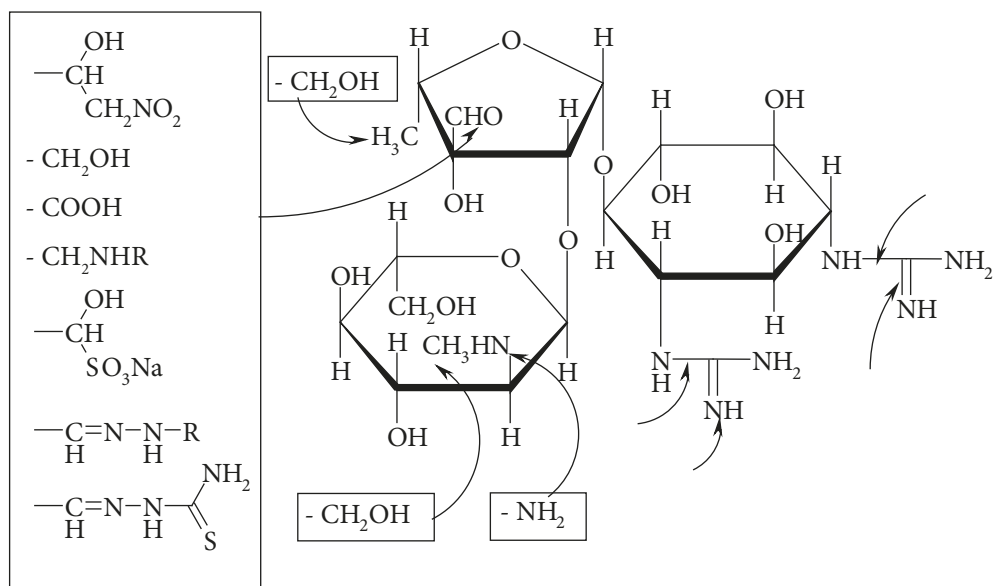


Схема 79. Схема модификаций стрептомицина

б) изменение в стрептозной части молекулы также не приводит к существенному изменению активности. Так, замена CH_3 группы на CH_2OH практически не отражается на биологических свойствах вещества;

в) альдегидную группу можно восстанавливать, получать гидразоны и тио-семикарбазоны, заменять на аминотетильную группу, однако это не приводит к существенному изменению активности, т.е. ни альдегидная, ни метильная группы не являются решающими в придании молекуле антибактериальных свойств.

Следовательно, молекула стрептомицина может подвергаться довольно существенным изменениям без потери своей биологической активности. Но и более активных соединений не найдено.

6.5.4. Стрептомициноподобные антибиотики.

Аминогликозиды, содержащие 2-дезоксистрептамин

К этой группе принадлежат многие антибиотики, и часть из них используется в медицинской практике.

В качестве агликона выступает 2-дезоксистрептамин (схема 80), который сам по себе биологической активностью не обладает. Но при одновременном замещении двух из трех

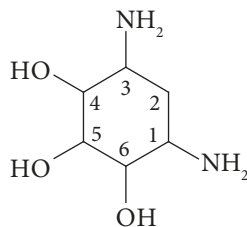


Схема 80. 2-Дезоксистрептамин

гидроксильных групп на сахарные остатки появляется достаточно высокая антимикробная активность.

Есть две группы 2-дезоксистрептаминсодержащих антибиотиков, используемых в клинике:

- 1) замещены оксигруппы в положении 4 и 5 стрептамина.
- 2) замещены оксигруппы в положении 4 и 6.

В 1-й группе сахарный остаток в положении 5 почти всегда рибоза, и когда к нему присоединяется еще один остаток аминсахара, активность увеличивается.

Производные дезоксистрептамина, замещенные по положениям 4 и 5

Наиболее известными представителями первой группы являются неомицины.

Неомицины

Продуцент — *Act. fradiae* — выделен в 1949 г. Ваксманом и Ле Шевалье из почвенного образца. Это смесь неомицинов А, В, С с преобладанием В (схема 81).

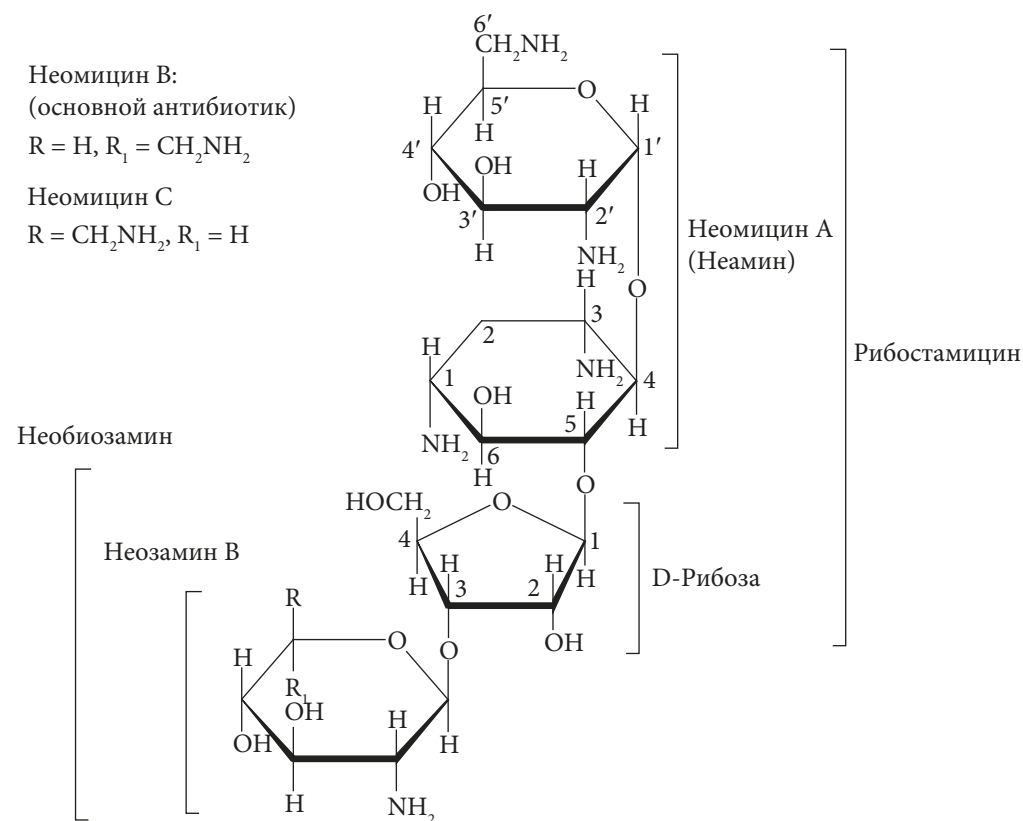


Схема 81. Строение природных неомицинов

Все основания хорошо растворимы в воде, в органических растворителях не растворимы. Устойчивы. В течение двух лет не теряют активности ни в твердом виде, ни в растворах.

Терапевтические свойства неомицина более высокие, чем стрептомицина. Спектр действия сходен со стрептомицином (широкий), включая умеренную активность в отношении *Streptococcus* и *Pseudomonas*. Устойчивость микроорганизмов развивается медленнее. Неомицин В подавляет развитие устойчивых к стрептомицину штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, но он более ото- и нефротоксичен. Применяется местно в дерматологии, хирургии, отоларингологии, при некоторых заболеваниях глаз, входит в состав мазей *синалар* и *лококартен*.

Неприродные неомицины

Получают методом мутосинтеза — это один из методов направленной ферментации, заключающийся в одновременном применении мутантных штаммов и предшественников.

Мутант получают путем генетических манипуляций. Такой штамм теряет способность синтезировать один или несколько фрагментов молекулы антибиотика. При внесении предшественника последний встраивается на свободное место. Таким способом в 1969 г. в США был получен мутант *Str. fradiae*, не способный синтезировать природный агликон. При добавлении в питательную среду аналогов 2-дезоксистрептамина удалось получить новые неомицины.

Канамицины. Производные дезоксистрептамина, замещенного по положениям 4 и 6

Группа антибиотиков-канамицинов была открыта сравнительно поздно и получила широкое распространение благодаря высокой активности природных антибиотиков этого класса и некоторых недавно полученных полусинтетических производных.

Первым представителем данной группы, используемым в медицине, был *канамицин А* (Umezawa, 1957), выделенный вместе с компонентами В и С из культуры *Str. kanamyceticus*. Строение выяснено в 1958 г. (схема 82).

Спектр действия канамицина близок к спектру действия стрептомицина, но он менее ототоксичен, нефротоксичность сохраняется. Антибиотик широкого спектра действия, действует на большинство грамположительных и грамотрицательных бактерий и на кислотоустойчивые бактерии, включая микобактерии туберкулеза. Он действует на штаммы микобактерий туберкулеза, устойчивые к стрептомицину, ПАСКу, изониазиду и другим противотуберкулезным препаратам; не действует на анаэробы, грибы, вирусы, простейшие. Канамицин сульфат используется для лечения туберкулеза, сибирской язвы, гонореи

(грамотрицательные микроорганизмы). При инфекциях ЖКТ в виде сульфата используется при парентеральном введении, как моносульфат — перорально.

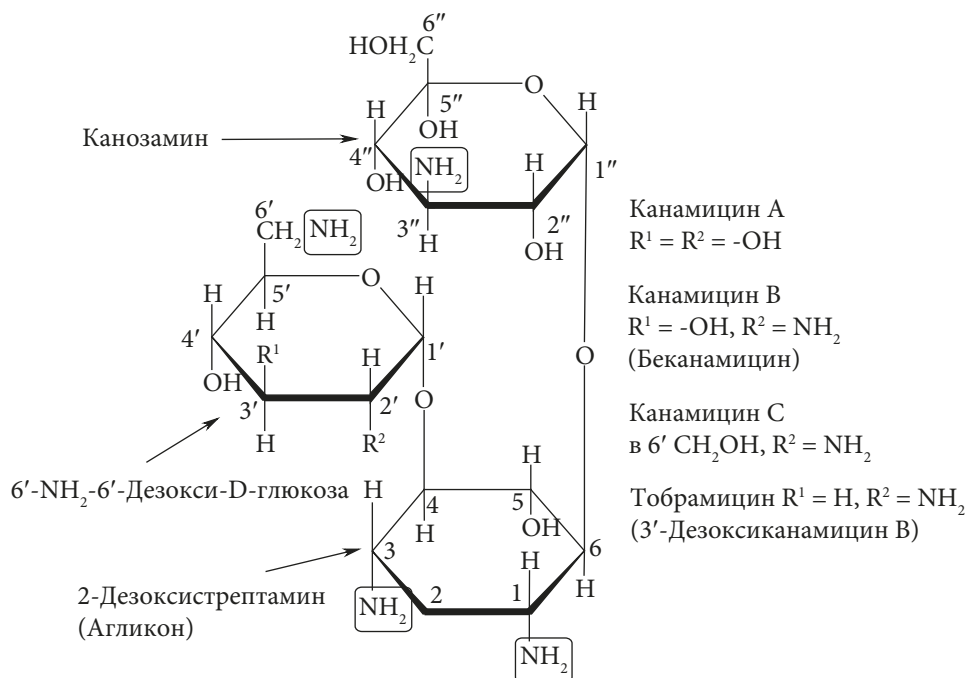


Схема 82. Строение канамицинов

Перспективные аминогликозиды — тобрамицин, сизомицин, гентамицины

В 70-х гг. XX в. в медицинскую практику внедрен *тобрамицин* (3'-канамидин В), продуцент *Str. tenebrarius* (см. схему 82). Активен в отношении *S. aureus* и грамотрицательных бактерий, в частности, проявляет очень высокую активность в отношении *Pseudomonas*, некоторых видов *Proteus*.

В это же время из природных источников выделены еще два аминогликозида, 4,6-производные 2-дезоксистрептамина с несколько измененной структурой сахарных остатков.

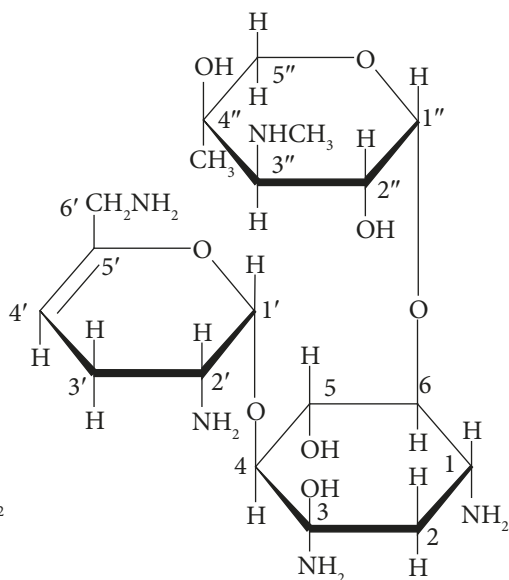
Гентамициновый комплекс — многокомпонентный (схема 83). Продуцент — *Micromonospora purpurea*. Название *гентамицин* относят к смеси гентамицинов C₁, C_{1a}, C₂, отличающихся степенью метилирования 6'-го углеродного атома сахарного остатка в положении 4. По спектру действия гентамициновый комплекс подобен тобрамицину. Очень высокая активность в отношении *Pseudomonas* и некоторых видов *Proteus*. Высоко токсичен в отношении вестибулярного аппарата и почек. В клинике используется широко, но только для лечения тяжелых заболеваний.

Гентамицины:

C1_A R = R' = H

C1 R = R' = CH₃

C2 R = CH₃, R' = H



Тобрамицин, гентамицин и сизомицин — это аминогликозиды 2-го поколения.

Поэтому ясно, что тобрамицин (3'-дезоксиканамицин В) активен в отношении *Pseudomonas*, а гентамицин и сизомицин не инактивируются ни фосфорилированием, ни присоединением нуклеотида, так как не имеют ОН группы в положениях 3' и 4'.

Так было получено производное сизомицина — *нетилмицин* (схема 85).

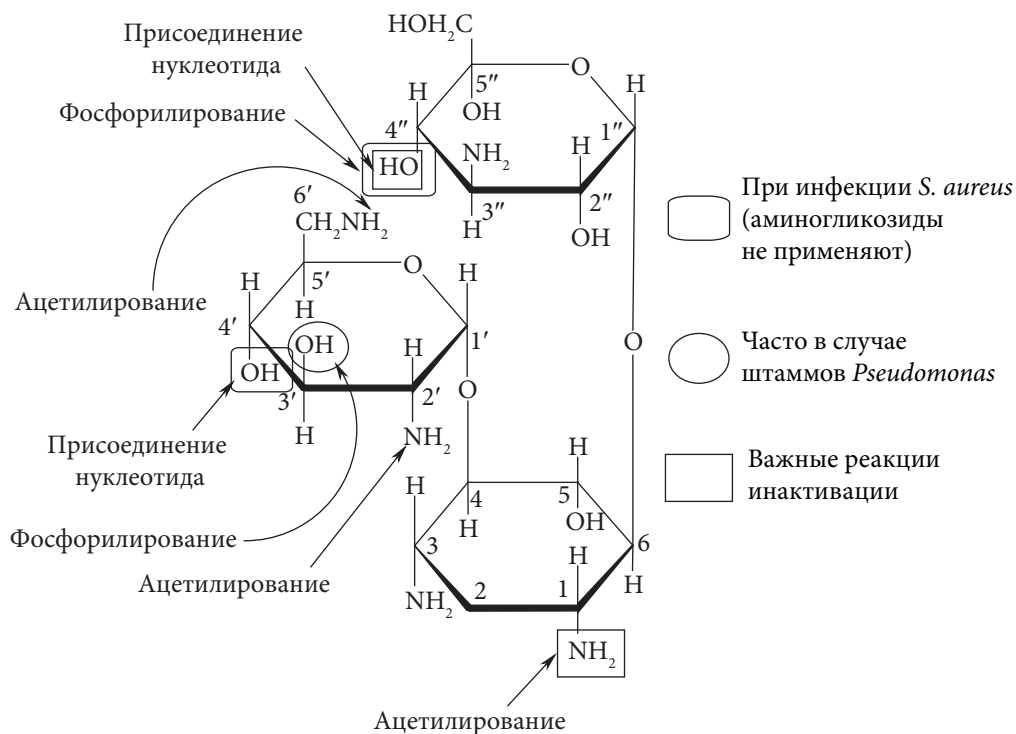


Схема 84. Связь между структурой и ферментативной инактивацией

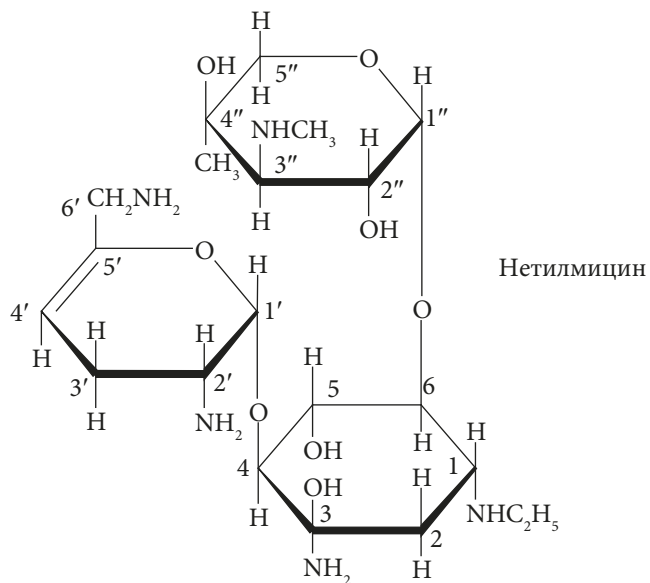


Схема 85. Строение нетилмицина

Главное преимущество этого антибиотика — большая стабильность к действию аденилирующих и ацетилирующих ферментов, менее токсичен, обладает более широким спектром действия, чем гентамицин.

В 1970 г. были открыты представители нового семейства аминогликозидов — *бутирозины*, продуценты *Bacillus circulans*, содержащие в молекуле остаток масляной кислоты (схема 86).

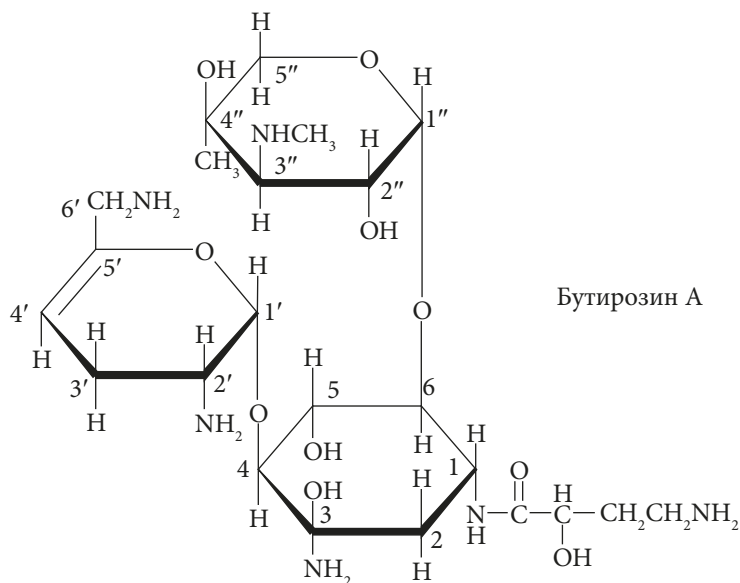


Схема 86. Строение бутирозина А

Бутирозин был высокоэффективен в отношении микроорганизмов, резистентных к стрептомицину, неомицину, канамицину и другим аминогликозидам. Однако наладить его производство по некоторым причинам было сложно. В связи с этим особенность его молекулы — остаток α -окси- γ -аминомасляной кислоты «перенесли» на канамицин. Целенаправленной химической модификацией в 1972 г. был получен *амикацин* (Япония; схема 87). Канамицин А ацилирован α -окси- γ -аминомасляной кислотой.

Амикацин подавляет рост бактерий, резистентных к канамицину, гентамицину, тобрамицину. Он устойчив практически ко всем известным защитным ферментам, воздействующим на канамицин и ряд других аминогликозидов. Амикацин уже давно сохраняет свое значение лучшего аминогликозида в современной клинике.

Преимущество этих антибиотиков состоит в том, что они не подвержены воздействию ферментов, инактивирующих все известные аминогликозиды. Это и послужило основанием для работ по химической модификации аминогликозидов.

Из канамицина В получено 3',4'-дезоксипроизводное — *дибекацин* (1975; схема 88).

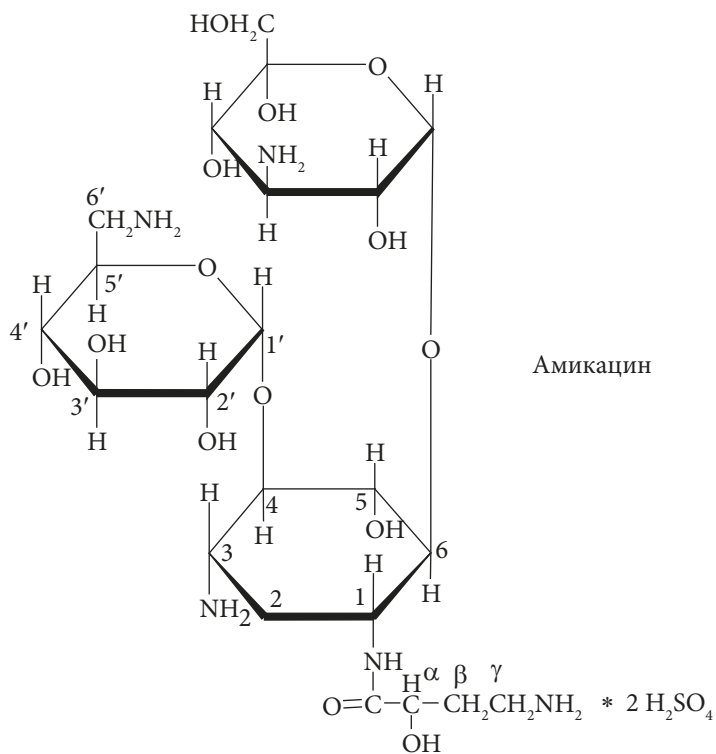


Схема 87. Строение амикацина

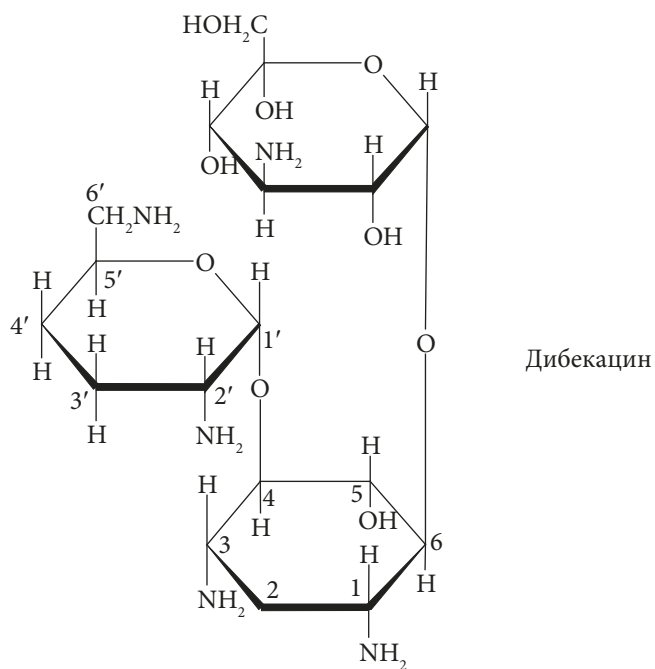


Схема 88. Строение дибекацина

Также из канамицина В был получен препарат *хабекацин* — производное дибекацина (схема 89).

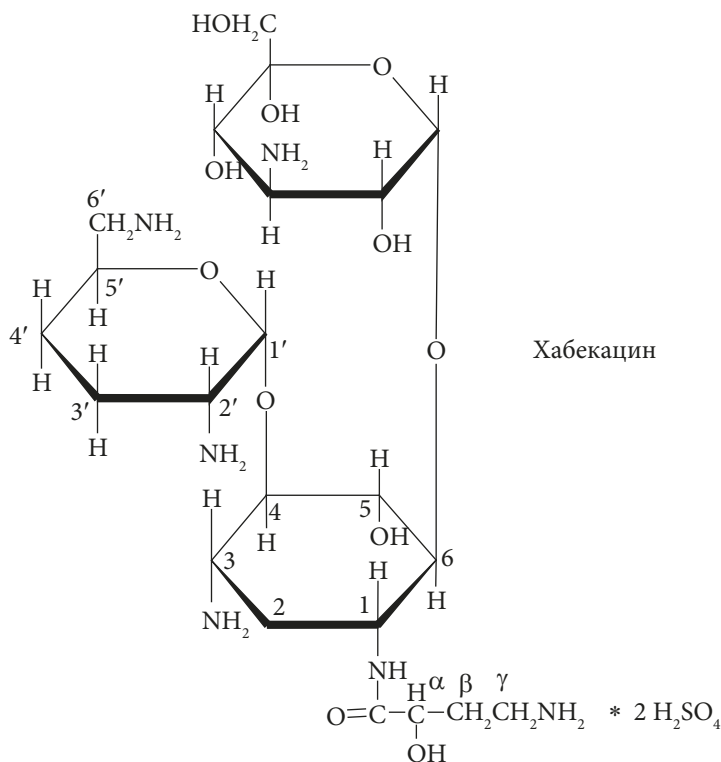


Схема 89. Строение хабекацина

Полученные производные нечувствительны к ферментам, катализирующим присоединение остатка фосфорной кислоты к гидроксиду в положении 3', к ферментам, катализирующим ацелирование аминогруппы в положении 3 2-дезоксистрептамина и нуклеотидную трансформацию ОН группы в положении 2''.

6.5.5. Зависимость антибиотического действия стрептомициноподобных антибиотиков от их строения

1. Каждый из остатков стрептомициноподобных антибиотиков биологической активностью не обладает. Необходимо присутствие как 2-дезоксистрептамина, так и углеводных компонентов.

2. Для проявления активности существенно наличие двух аминогрупп в положении 1,3 остатка 2-дезоксистрептамина. Любые замещения этих групп ведут к уменьшению активности. Исключение составляет замещение аминогруппы при С-1 канамицина, сизомицина, которое сообщает антибиотику ценные свойства.

5. Максимальная активность имеет место при наличии двух аминогрупп в 2' и 6' положениях гексозамина. Когда аминогруппа присутствует в одном из этих положений, активность уменьшается.

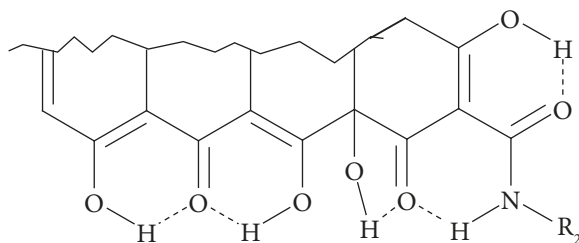


Схема 92. Водородные связи в молекуле тетрациклинов

Механизм действия

Тетрациклины — ингибиторы синтеза белка на уровне рибосом: ингибируют связывание аминоацил-т-РНК с А-местом рибосомы на 30S рибосомной субчастице, т. е. ингибируется процесс инициации и элонгации полипептидной цепи. Предполагается, что молекула тетрациклина, фиксированная рибосомой через Mg-мостик, находится в районе взаимодействия кодона м-РНК с антикодоном т-РНК в А-месте 30S субчастицы и нарушает их взаимодействие. Тетрациклин удерживается на рибосоме за счет водородных связей, одной ионной, липофильных и слабых взаимодействий. Во взаимодействие включаются не только 16Sp-РНК, но и белки S7, S3, S14, S19.

Теоретически они должны быть токсичны, так как в бесклеточной системе действуют и на 40S субчастицы рибосом клеток эукариот, но в самом деле хорошо переносятся больными. Специфичность токсического действия тетрациклинов на бактерии — они способны накапливать эти антибиотики. Возможно, это свойство, а также активность тетрациклинов связаны с их способностью образовывать хелатные комплексы с двухвалентными металлами Ca^{2+} , Mg^{2+} . Другая причина — различия в проницаемости клеточных мембран эукариот. Тетрациклины применяются также в качестве диагностических средств для диагностики рака желудка, так как обладают способностью избирательно накапливаться в опухолевой ткани и при облучении они начинают флуоресцировать.

6.6.1. Природные тетрациклины

Хлортетрациклин. Первый антибиотик этой группы был получен в 1948 г. из культуральной жидкости лучистого грибка *Str. aureofaciens*, выделенного из почв в долине р. Миссури. Он получил название *ауреомицин* — «желтое вещество из гриба», поскольку имел желтый цвет. Сейчас он называется *биомицин*, или *хлортетрациклин*. Строение установлено в 1952 г. (схема 93).

В молекуле присутствуют заместители, обладающие как кислотными, так и основными свойствами. Таким образом, это соединение имеет амфотерный характер. Основные свойства — способность давать соли с кислотами — обусловлены наличием $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ группы; кислотные свойства обусловлены OH

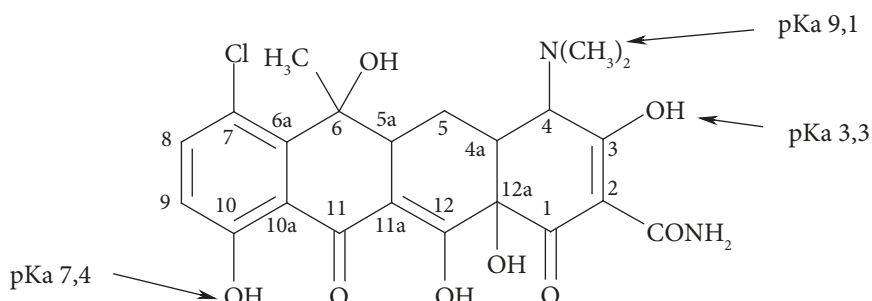


Схема 93. Структура хлортетрациклина

группой в положении С-3 и фенольным ОН у С-10. По этим группам образуются соли с веществами основного характера. Хлортетрациклин плохо растворим в воде, хорошо — в низших спиртах. Соли с минеральными кислотами также плохо растворимы в воде. Соли с одновалентными металлами хорошо растворимы в воде.

Характерно образование комплексов с двухвалентными металлами. Состав этих комплексов представлен на схеме 94.

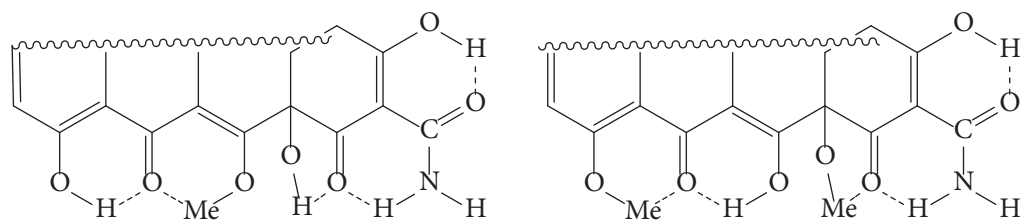


Схема 94. Комплексы тетрациклинов с двухвалентными металлами

Они совершенно нерастворимы в воде (данное свойство используется в производстве при выделении).

Устойчивость. Хлортетрациклин на воздухе медленно разлагается. Также ведут себя соли со щелочными металлами и органическими аминами. Соли с минеральными кислотами более устойчивы (их можно хранить более года).

Растворы инактивируются в зависимости от рН среды, в щелочных средах — особенно неустойчивы (табл. 7). Например, при рН 14 инактивируется на 50 % через 40 с, а при рН 7,6 — на 50 % через 12 ч.

Таблица 7

**Ход инаktivации раствора хлортетрациклина при рН 8
в 5 % растворе NaHCO_3 при 25 °С**

Время, ч	0	1,5	3,0	4,5	9,0	24,0
Количество оставшегося хлортетрациклина, мкг	599	265	120	52	7	0

Неустойчивость определяется третичной спиртовой группой у С-6. В щелочных средах происходит разрыв кольца с утратой активности (схема 95, а).

В кислых средах хлортетрациклин более устойчив, однако может также инактивироваться, превращаясь в ангидрохлортетрациклин (схема 95, б).

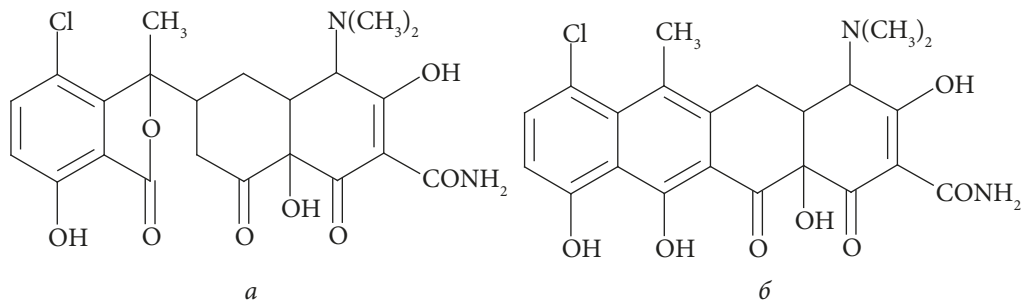


Схема 95. Разложение хлортетрациклинов

Окситетрациклин (террамицин)

Окситетрациклин (ОТЦ) выделен в 1950 г. Финли и Хотби. Продуцент *Actinomyces rimosus* выделен из почв субтропиков. Строение установлено в 1952 г. Хокстайном и Стефенсом (схема 96).

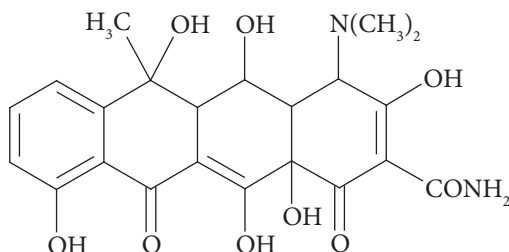


Схема 96. Строение окситетрациклина

Имеет амфотерный характер. В виде дигидрата плохо растворим в воде.

Соли с натрием, калием хорошо растворимы в воде, с кальцием, барием, магнием (комплексные соли) — нерастворимы в воде. Соль с HCl хорошо растворима.

Зона наименьшей растворимости в воде (табл. 8) лежит в области pH от 4,0 до 6,0 (700–850 мкг/мл).

Таблица 8

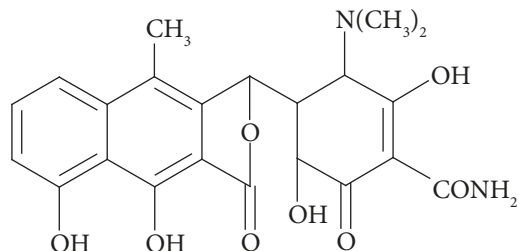
Растворимость ОТЦ в воде при различных значениях pH при 23 °С

pH	1,2	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
Растворимость, мкг/мл	31 400	4 600	1 400	850	500	700	11 000	21 000	38 000
				Зона наименьшей растворимости					

Устойчивость. В отличие от хлортетрациклина ОТЦ более устойчив как в щелочных, так и в кислых средах.

Разложение в кислых средах приводит к следующим конечным неактивным продуктам (схема 97).

В водной среде в присутствии HCl:



В безводной среде в присутствии HCl:

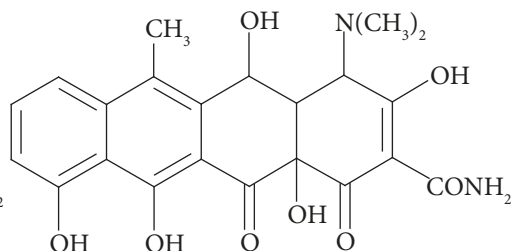


Схема 97. Разложение окситетрациклина

Тетрациклин

Природным продуцентом тетрациклина (схема 98) является *Str. viridifaciens*, выделенный из почвы в 1952 г. Однако ранее этот антибиотик был получен другими путями, о которых речь пойдет дальше. Промышленным способом получения тетрациклина является биосинтез с продуцентом хлортетрациклина *Str. aureofaciens* с использованием ингибиторов процесса хлорирования.

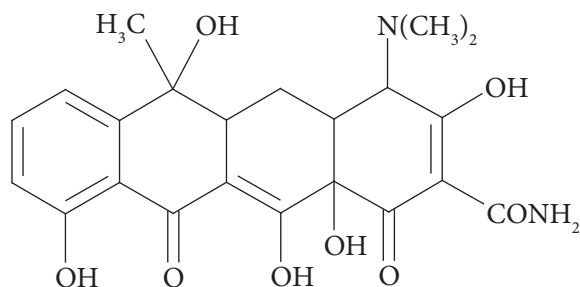


Схема 98. Строение тетрациклина

Тетрациклин плохо растворим в воде и спирте. Гидрохлорид лучше растворим в спирте.

Этот антибиотик более стоек в щелочных растворах, чем ОТЦ и хлортетрациклин.

Применение тетрациклинов

Первым антибиотиком тетрациклинового ряда, внедренным в медицинскую практику, был хлортетрациклин, обладавший наибольшей антибактериальной активностью. Однако при физиологических значениях pH он является наименее

стойким из природных тетрациклинов и вызывает больше побочных реакций. Поэтому в медицине применяют в основном тетрациклин и окситетрациклин, последний является также исходным продуктом для получения эффективных полусинтетических производных и выпускается в промышленности в больших количествах.

Спектр действия всех тетрациклинов сходен. В виде оснований и гидрохлоридов тетрациклин и окситетрациклин применяется для лечения инфекций дыхательных путей, коклюша, холеры, гонореи, бруцеллеза, сыпного тифа (риккетсиоз), трахомы, герпеса, для профилактики и лечения инфекционных осложнений после операций, особенно в брюшной полости. Местно — для лечения ожогов.

Терапевтическая эффективность всех тетрациклинов примерно одинаковая, и все они хорошо всасываются при приеме внутрь. Ко всем этим антибиотикам наблюдается перекрестная устойчивость.

К недостаткам относятся:

- побочные реакции в виде тошноты, раздражения слизистой желудка;
- при длительном применении болезненные изменения в печени, дисбактериоз.

При биосинтезе в качестве побочных продуктов образуются 2-ацетил-2-декарбоксамидотетрациклины (схема 99).

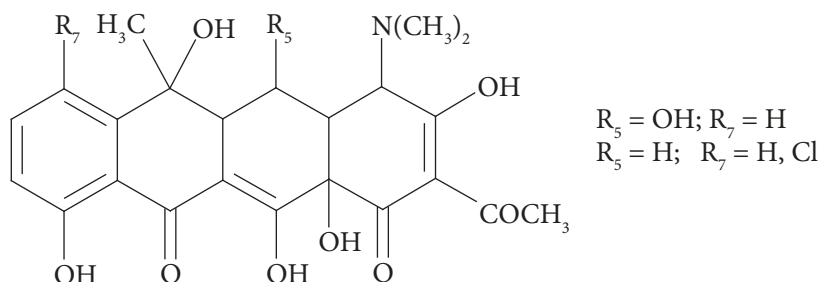


Схема 99. Декарбоксамидотетрациклины

Антибактериальная активность их низка.

6.6.2. Неприродные тетрациклины

При создании неприродных тетрациклинов решались следующие задачи:

1. Повышение устойчивости при физиологических значениях pH;
2. Увеличение растворимости при нейтральных значениях pH;
3. Повышение активности к тетрациклиновым формам бактерий;
4. Пролонгация действия.

сульфазин. При добавлении их в питательную среду получают 6-дезметилпроизводные тетрациклина (схема 102). Это промышленный способ их получения.

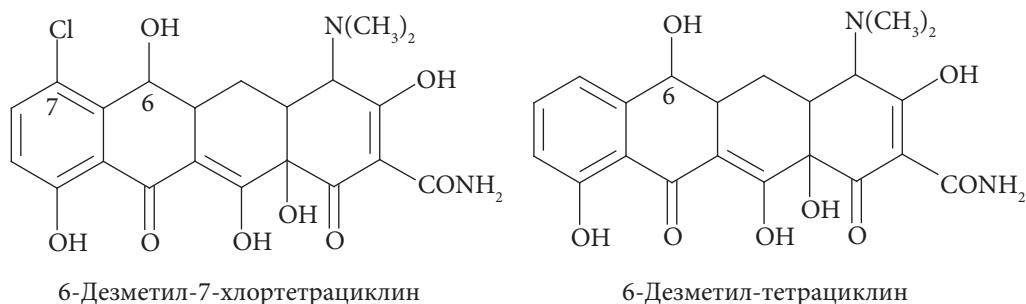


Схема 102. Дезметилпроизводные тетрациклина

3. Метод с применением мутантных штаммов с неактивным метилирующим ферментом.

Такой метод впервые применил МакКормик. В 1957 г. он использовал мутант S-604 *Str. aureofaciens*-A-377 и получил дезметилхлортетрациклин вместо хлортетрациклина. Мутант *Str. aureofaciens* может синтезировать также тетрациклин при ингибировании процесса хлорирования.

Таким же методом можно получить дезметилтетрациклин (мутант 216 и 28 *viridifaciens*) и дезметилокситетрациклин (*A. rimosum*). Дезметилтетрациклин в промышленности получают этим способом.

Данные два неприродных тетрациклина отличаются:

- 1) большей устойчивостью в кислых и щелочных средах, что объясняется отсутствием в их молекулах третичной спиртовой группы;
- 2) дольше задерживаются в крови, т. е. обладают пролонгированным действием. Доза в 2 раза ниже, интервал между введениями в 2 раза продолжительнее. Менее выраженное побочное действие;
- 3) на некоторые стафилококки, сальмонеллы, шигеллы и даже протей или синегнойную палочку они действуют сильнее;
- 4) дезметилхлортетрациклин применяется для диагностики рака желудка при пероральном введении.

4. Метод химической трансформации тетрациклинов, или метод полусинтеза.

4.1. Реакции по CONH_2 (карбоксамидной) группе.

Реакция Эйнхорна с формалином и амином для тетрациклинов протекает с участием карбоксамидной группы и приводит к получению водорастворимых производных.

Так, например, был получен препарат *реверин* (схема 103). Спектр биологического действия реверина остается прежним, но растворимость выше. В водных растворах он гидролизуетсся с высвобождением тетрациклина.

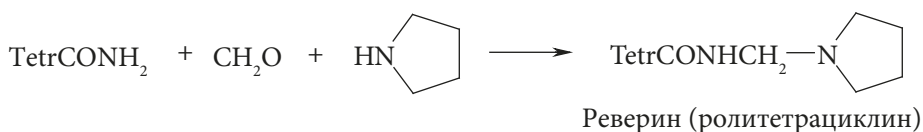


Схема 103. Реакция Эйнхорна

Растворимость *морфоциклина* и *гликоциклина* (схема 104), полученных аналогичным способом, в тысячи раз превышает растворимость тетрациклина. Гликоциклин используется для диагностики рака желудка (при внутривенном введении). Растворы вводят парентерально, при этом нет болезненности и раздражения в месте введения, снижена опасность кандидозов.



Схема 104. Структуры морфоциклина и гликоциклина

4.2. Солеобразование.

В медицинской практике наиболее широко применяются гидрохлориды тетрациклиновых антибиотиков по диметиламиногруппе. Однако для солеобразования используют также кислотные группы. Так, тетрациклин с *N, N*-дибензилэтилендиамином дает соль, которая называется *дитетрациклин* (применяется в виде мази). Этот препарат обладает пролонгированным действием, применяется один раз в день вместо 5 раз (тетрациклин). Дитетрациклин активен для лечения трахомы и других глазных болезней.

4.3. Удаление оксигруппы, находящейся у C-6, с целью увеличения устойчивости.

Цепочкой химических превращений, начиная с обработки галогенсукцинимидом, были получены 6-метил- и 6-дезоксипроизводные тетрациклинов (схема 105).

Из таких производных два (*доксициклин* и *рондомицин*) нашли широкое применение в медицине (схема 106).

Доксициклин и рондомицин обладают широким спектром действия, высокой активностью, пролонгированным действием (период полураспада 18–22 ч). Лечебная доза примерно в два раза ниже, чем у ОТС, максимальная концентрация в крови через 2–3 ч. Хорошо всасывается из ЖКТ.

Доксициклин плюс рифамицин используются при лечении острой формы бруцеллеза, чумы, туляремии, клещевого возвратного тифа, хламидиальных инфекций, холеры и ряда других кишечных инфекций.

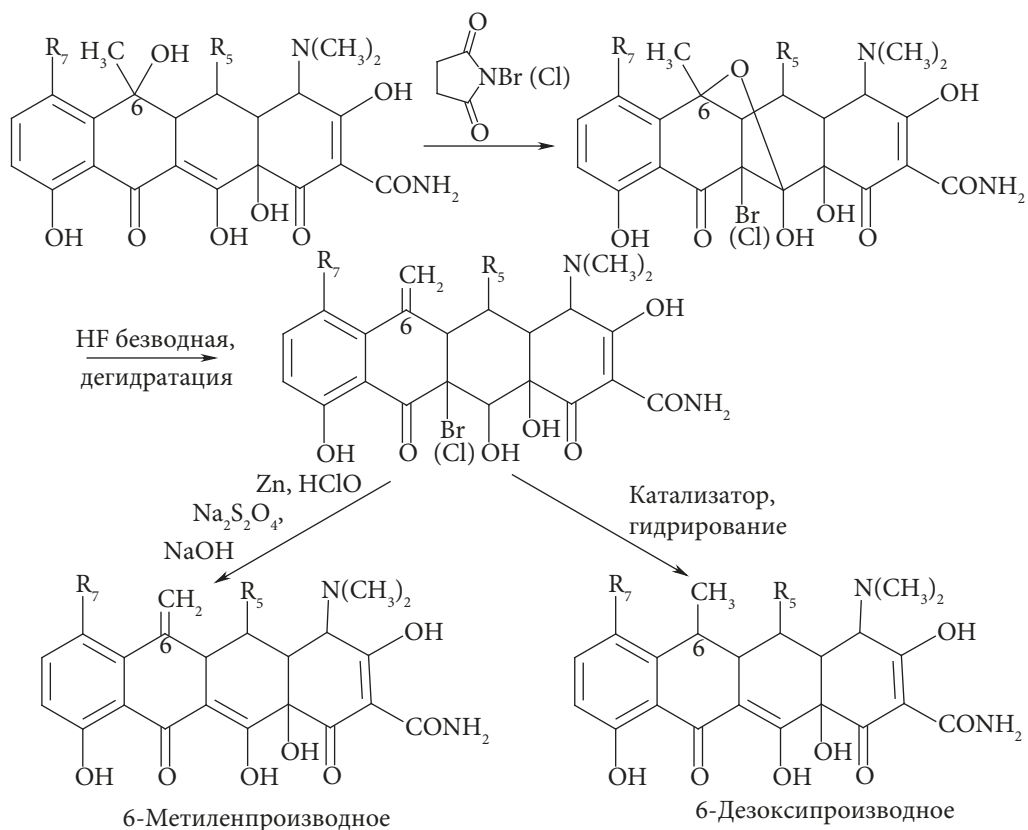


Схема 105. Синтез 6-метилен и 6-дезокситетрациклинов

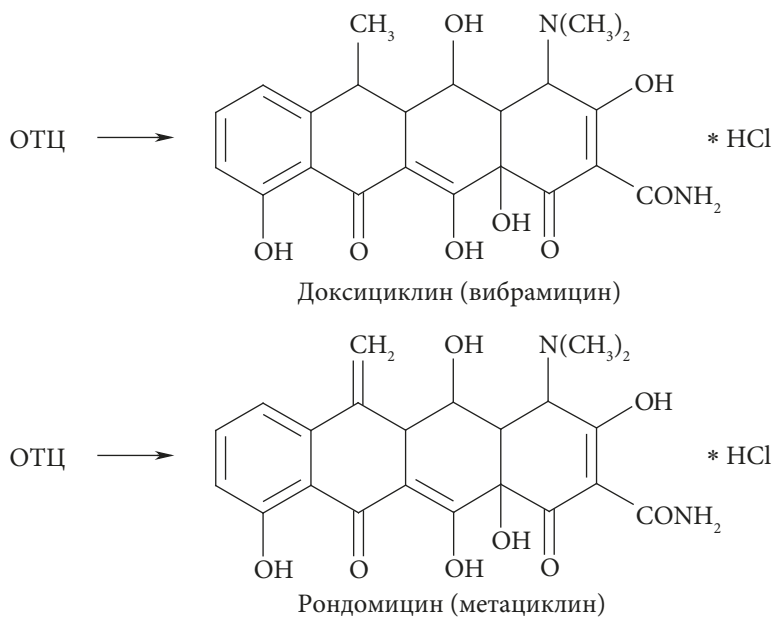


Схема 106. Синтез доксициклина и рондомицина

4.4. Гидрогенолиз 6-дезметилтетрациклинов.

Гидрогенолизом 6-дезметилтетрациклинов с использованием катализатора родия в особых условиях был получен 6-дезметил-6-дезокситетрациклин (схема 107).

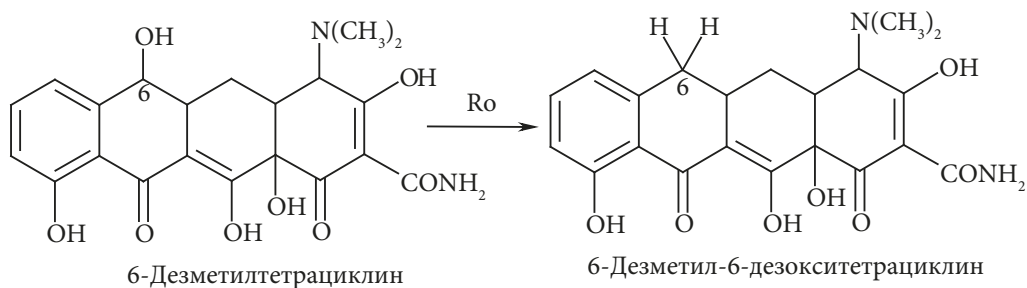


Схема 107. Получение 6-дезметил-6-дезокситетрациклина

Активность 6-дезметил-6-дезокситетрациклина существенно не меняется, он является исходным веществом для введения заместителей в С-7 и С-9 положения молекулы.

4.5. Дегалогенирование.

Дегалогенирование хлортетрациклина — это лабораторный метод получения тетрациклина из хлортетрациклина (схема 108).

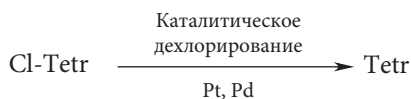


Схема 108. Получение тетрациклина методом дегалогенирования

Так как тетрациклин более устойчив в нейтральной и щелочной средах, его предпочитают хлортетрациклину.

4.6. Введение заместителей в С-7 и С-9 положения тетрациклинов (электрофильное замещение водорода в ароматическом кольце) и дальнейшие модификации.

Объектом этих превращений могут быть как все природные, так и неприродные тетрациклины, включая те, которые получены в процессе удаления OH и CH₃ группы из положения С-6.

Было показано, что нитрование идет преимущественно в С-7, а потом в С-9- положение (соотношение 4: 1). Если при С-6 есть оксигруппа, то нитруют тетрафторборатом нитрония [NO₂]⁺BF₄⁻. Если оксигруппы в С-6 нет, то нитруют обычными нитрующими средствами. Активность нитропроизводных мала.

Восстановление нитрогруппы до аминогруппы проводят обычными средствами с дальнейшим ацилированием, алкилированием, диазотированием и реакциями с выделением и без выделения азота (схема 109).

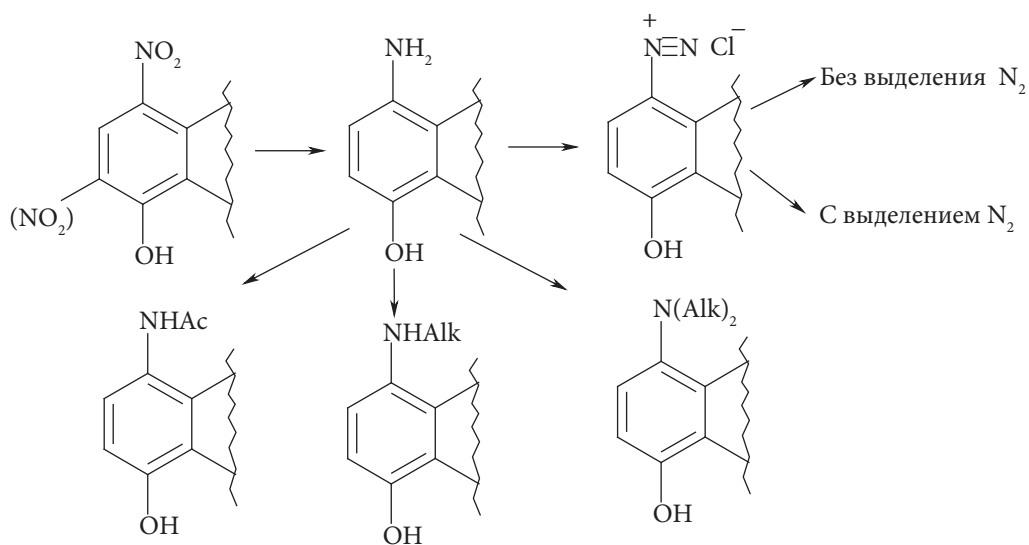


Схема 109. Превращения нитропроизводных тетрациклинов

Из полученных с помощью этих превращений соединений наиболее активны 7-диметиламино-6-дезокситетрациклин (схема 110), 7-амино-6-дезметил-6-дезокситетрациклин, 7-метиламино-6-дезметил-6-дезокситетрациклин и миноциклин (схема 111).

Миноциклин активнее тетрациклина в 4 раза при парентеральном и в 5 раз при пероральном введении по отношению к возбудителю пневмонии. МИК тетрациклина составляет 150 мкг/мл, МИК миноциклина — 10 мкг/мл. На штаммах, устойчивых к тетрациклину, пенициллину, стрептомицину и эритромицину он активен в дозе 16 мг/кг, тогда как тетрациклин — в дозе 2048 мг/кг.

Также при изучении реакций электрофильного замещения в ароматическое кольцо было установлено, что реакция азосочетания солей диазония с тетрациклинами протекает в положение С-7, а если оно занято, то в С-9. Галогенирование бромом, йодом, *N*-бромсукцинимидом идет сначала в 11а, а потом

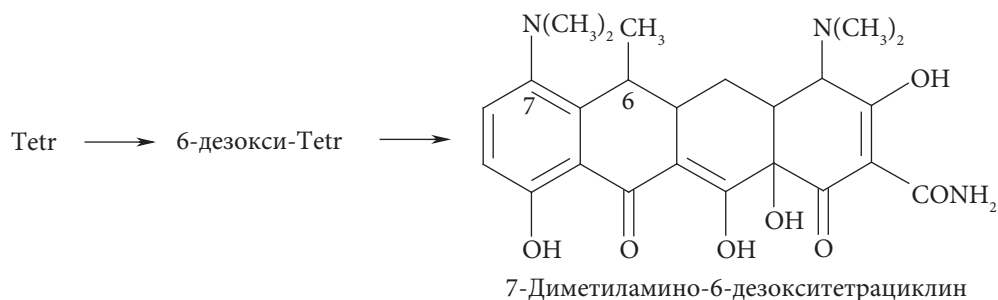


Схема 110. Последовательность превращения тетрациклина в 7-диметиламино-6-дезокситетрациклин

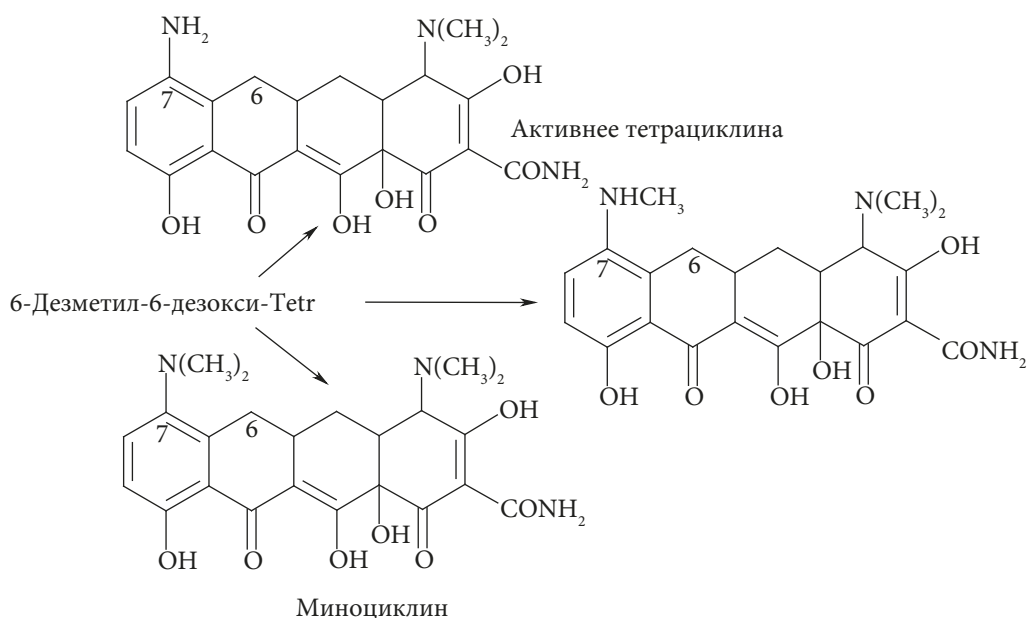


Схема 111. 7-Аминопобудовані 6-дезметил-6-дезокситетрацикліна

в положення С-7. Якщо існує метиленова група в С-6, то спочатку галогенується вона, а потім протікає електрофільне заміщення по положенню С-7.

Перспективи одержання тетрациклінів хімічним синтезом

Незважаючи на складність структури, в 1968 г. в Англії був здійснений синтез тетрацикліна, а в СРСР в Інституті ім. М. Шемякіна (сьогодні Інститут біоорганічної хімії) — окситетрациклін. Однак виходи були дуже малі.

Роботи по синтезу неприродних тетрациклінів проводилися в ряду наукових лабораторій. Так, ученим в 24 стадії з *p*-хлор-*m*-крезолу вдалося отримати новий антибіотик, будова якого представлено на схемі 112.

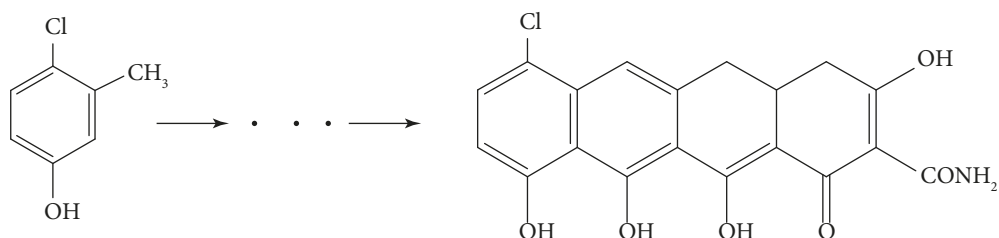


Схема 112. Синтез неприродного тетрацикліна з *p*-хлор-*m*-крезолу

В 1980 г. був описаний синтез 6-тіатетрацикліна (схема 113) з 2-хлор-5-метокситіофену в 10 стадій.

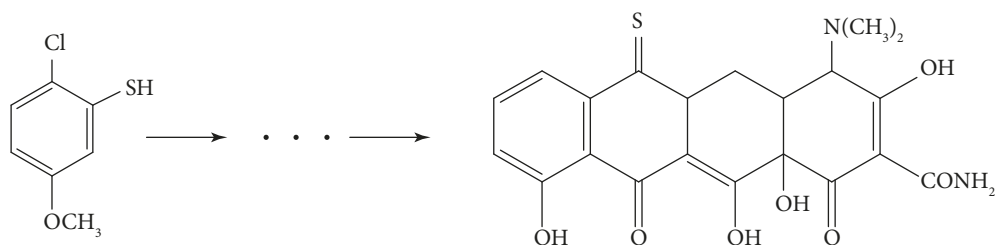


Схема 113. Синтез не природного тетрациклина из 2-хлор-5-метокситиофенола

6.6.3. Связь между структурой и функцией в ряду тетрациклинов

На схеме 114 представлены направления модификации тетрациклинов, которые приводили к получению активных производных. Видно, что не удалось получить активных соединений путем каких-либо изменений «нижней периферии» молекулы, сопровождающихся нарушением сложной системы водородных связей. По местам же, не входящим в этот «запретный район», возможны разнообразные модификации, приводящие иногда к получению либо высокоактивных соединений, либо хорошо растворимых (производные по C-2), либо более устойчивых (6-дезметил- или 6-дезоксипроизводные). Получены тетрациклины, активные к устойчивым формам бактерий (производное по C-7-миноциклин). Таким образом, достигнуты все цели, поставленные перед химиками.

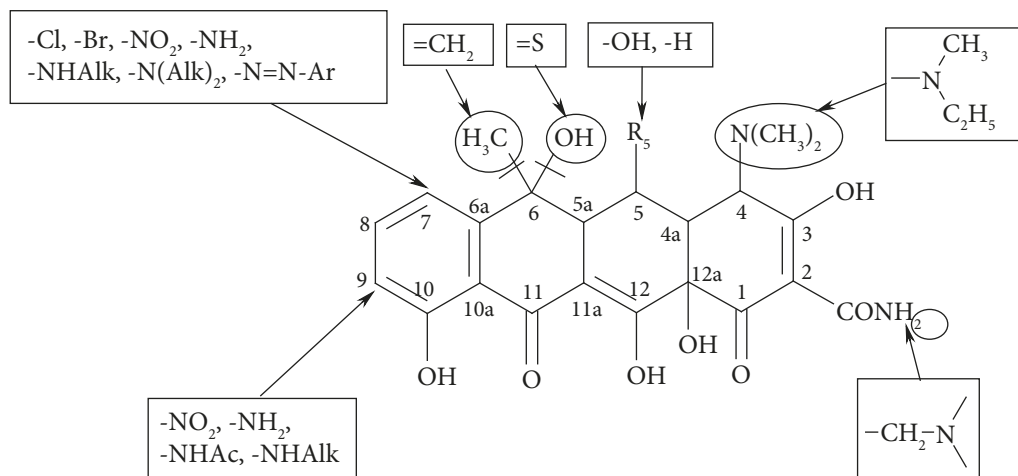


Схема 114. Связь между структурой и функцией в ряду тетрациклинов

Однако поскольку у вновь синтезированных тетрациклинов развивается перекрестная устойчивость с исходными тетрациклинами, то поиски в области синтеза новых тетрациклинов ведут лишь немногие лаборатории.

6.7. Макролиды

Характерной особенностью этих антибиотиков является наличие в их молекулах крупного алифатического (макроциклического) лактона (лактон — внутренний сложный эфир), связанного с одним или двумя углеводными остатками. По предложению Р. Вудворда (1957) эти антибиотики были названы *макролидами*.

По биологическому действию и особенностям химического строения они делятся на следующие группы:

1. *Макролиды 1-го типа*, обладающие избирательным действием на патогенные грибки. Их лактонное кольцо содержит сопряженные двойные связи, и поэтому их называют полиенами (триенами, тетраенами и т. д.).

2. *Макролиды 2-го типа*, высокоактивные против большинства грамположительных бактерий, с успехом замещающие пенициллин в случае образования пенициллиноустойчивых форм бактерий.

6.7.1. Макролиды 1-го типа. Противогрибковые макролиды-полиены

Изучением полиеновых антибиотиков 1-го типа занимаются два научных центра: АООТ «Технологический институт антибиотиков и ферментов медицинского назначения» в Санкт-Петербурге и Ратгерский университет, а также крупная фармацевтическая компания «Сквибб» (США).

Особенности химического строения

Полиены характеризуются очень большими размерами лактонного кольца (от 26 до 38 атомов) и наличием системы сопряжения двойных связей (от 3 до 7). Антимикробная активность увеличивается с увеличением числа сопряженных двойных связей. Общим свойством макролидов этого класса является наличие у углеродных атомов кольца нескольких оксигрупп в положениях напротив двойных связей, так что молекула имеет две разные области — гидрофильную и гидрофобную — и поэтому является поверхностно-активным веществом. Характерно также наличие карбоксильной группы в макролидном кольце и аминоксахара. Следовательно, для них характерна амфотерность. Всего известно около 300 макролидов-полиенов, широко используются из них лишь немногие.

Механизм действия

Для полиенов типична активность в отношении грибов, иногда некоторых простейших, и только в исключительных случаях они действуют на бактерии. Это объясняется механизмом их действия, заключающимся в изменении функционирования и целостности клеточной мембраны в результате образования комплексов со стеринами, компонентами мембран клеток эукариот: гидрофобная

часть молекулы, связываясь со стеринами мембраны, образует комплекс антибиотик-стерин, а гидрофильная часть образует водную пору внутри мембраны.

Антимикробное действие

Грибковые инфекции в настоящее время являются одной из важнейших проблем здравоохранения. Рост числа грибковых заболеваний вызывается загрязнением окружающей среды, повышением радиоактивного фона, нерациональным применением в практической медицине антибиотиков широкого спектра действия и целым рядом других факторов.

Противогрибковые препараты для лечения микозов представлены главным образом полиеновыми макролидами, основным из которых является *амфотерицин В* (*амфостан*, *фунгилин*), благодаря его высокой активности и широкому спектру действия, клинической эффективности и особенностям фармакокинетики.

Амфотерицин В

Продуцент амфотерицина В *Str. nodosus* был выделен в 1955 г. из почв долины р. Ориноко в Венесуэле. Наряду с амфотерицином В этот штамм продуцирует также тетраеновый антибиотик амфотерицин А.

Химическое строение амфотерицина В было установлено рядом исследовательских коллективов, возглавляемых Коуном и Боровским в 1966–1970 гг. (схема 115).



Схема 115. Строение амфотерицина В

Агликон — амфотеринолид В представляет собой 38-членное лактонное кольцо, содержащее в своем составе 14 хиральных центров, обусловленных гидроксильными группами, находящимися в положении 1,3 друг к другу, и системе 7 сопряженных двойных связей, имеющих полностью трансконфигурацию. В составе молекулы агликона антибиотика имеется внутреннее гемикетальное

кольцо, образуемое за счет взаимодействия карбонила C-13 и гидроксила при C-17 (подтверждено ЯМР).

Макролактонное кольцо амфотерицина В жесткое и неспособно к значительным конформационным перестройкам.

Микозамин — 3,6-дидезокси-3-амино-β, D-маннопираноза. Благодаря наличию COOH группы и аминогруппы амфотерицин В — амфотерное соединение.

Амфотерицин В — вещество желтого цвета, практически нерастворим в воде, углеводородах, эфире, ацетоне, мало растворим в диметилформамиде и метаноле, растворим в диметилсульфоксиде. Прибавление воды в количестве 5–30 % к органическому растворителю увеличивает растворимость. Хорошо растворим в системе метанол — CaCl₂, растворимость увеличивается при увеличении концентрации соли. Неустойчив к действию hν, O₂, t°. Нет четкой температуры плавления, темнеет при 150 °С. Инактивируется в кислой и щелочной среде.

Биологическая активность амфотерицина В

Амфотерицин В высокоактивен в отношении многих патогенных грибов, не поддающихся лечению другими противогрибковыми средствами, например, плесневых микозов. Используется внутривенно для лечения тяжелых генерализованных микозов. Амфотерицин В незаменим при лечении таких заболеваний, как глубокие микозы: бластомикоз, кокцидоз, криптококкоз, трудно поддающихся лечению. Очень токсичен, главным образом для почек. Действует на ЦНС. Поэтому его используют по жизненным показаниям. При местном или пероральном введении менее токсичен.

Полусинтетические (неприродные) полиены

Недостатками амфотерицина В, ограничивающими сферу его применения, являются:

- нерастворимость в воде;
- плохая всасываемость из ЖКТ;
- плохое проникновение в спинномозговую жидкость;
- уникально высокая токсичность в отношении почек, побочные реакции (часто непредсказуемые).

Поэтому целый ряд работ направлен на модификацию его структуры и синтез производных с целью:

- получения водорастворимых соединений;
- снижения токсичности;
- получения более эффективных препаратов.

Производные амфотерицина В можно разделить на следующие группы:

- 1) производные ионного характера (соли, комплексы) и солюбилизированные препараты;

2) вещества, модифицированные по функциональным группам молекулы антибиотика.

Из производных первой группы получены водорастворимые соли щелочных металлов и соли с HCl , H_2SO_4 , H_3PO_4 , H_3BO_4 . Получают их добавлением к метанольной суспензии амфотерицина В спиртовых растворах щелочей и кислот с последующим осаждением солей эфиром или этилацетатом.

Соли амфотерицина В обладают биологической активностью на уровне исходного антибиотика, несколько большей растворимостью в воде и значительно лучшей в спирте. Исключение составляет борат амфотерицина, он в 200 раз превосходит амфотерицин В по растворимости с сохранением 80 % исходной биологической активности.

Оригинальный водорастворимый препарат *амфоглюкамин* — соль с *N*-метилглюкамином, добавленным в качестве стабилизатора (схема 116).

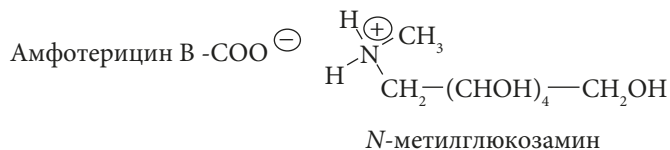


Схема 116. Строение амфоглюкамина

Амфоглюкамин малотоксичен при пероральном и внутримышечном введении, значительно токсичен при внутривенном введении. При лечении амфоглюкамином отсутствуют побочные реакции, свойственные амфотерицину В — нефротоксичность, угнетение ЦНС, нарушение терморегуляции. Хорошо переносится даже в больших дозировках и при продолжительном лечении.

Показано также, что амфотерицин В легко образует комплексные соединения с поливалентными ионами металлов (катионами Al, Fe, Ni, Co, Ca и др.), с анионами органических кислот (лимонной, щавелевой, янтарной и др.), дезоксихолатом натрия, поливинилпирролидоном (ПВП), γ -циклодекстрином, полисахаридами. Комплексообразование с катионами металлов проводят в метаноле, смешивая растворы антибиотика с растворами солей металлов, с последующей нейтрализацией растворов до pH 6–7. Комплексные соединения амфотерицина В с катионами металлов хорошо растворимы в воде и обладают противогрибковой активностью на уровне исходного антибиотика.

Комплексные соединения амфотерицина В с дезоксихолатом натрия, поливинилпирролидоном, γ -циклодекстринами и полисахаридами следует рассматривать как солюбилизированные производные, водные растворы которых обладают свойствами ассоциированных поверхностно-активных веществ полукolloидного типа. Диспергированные в воде, они образуют тонкие взвеси в широком интервале pH.

Комплекс амфотерицина В с дезоксихолатом натрия под названием *фунгизон* выпускается фирмой «Сквибб» (США) и ее зарубежными филиалами.

Сорбционные комплексы амфотерицина В с поливинилпирролидоном (ПВП) получают соосаждением антибиотика с полимером в среде апротонных растворителей. Комплексы представляют собой твердые дисперсии, в которых антибиотик и полимер связаны за счет водородных связей по схеме 117.

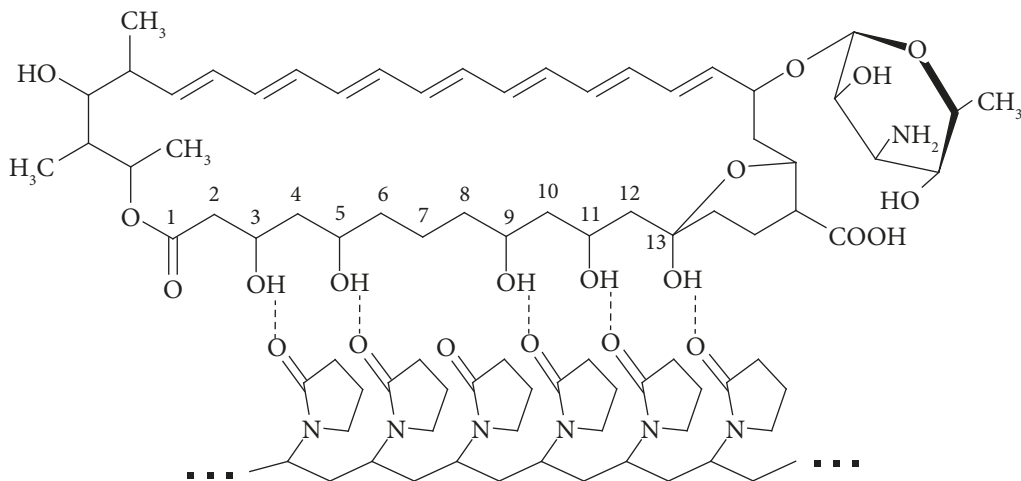


Схема 117. Водородные связи в сорбционном комплексе амфотерицина В с поливинилпирролидоном

Комплексы амфотерицина В с ПВП при растворении в воде и в жидкостях ЖКТ образуют прозрачные коллоидные растворы или высокодисперсные суспензии. В таком состоянии препараты хорошо всасываются и по терапевтическому эффекту не уступают прочим водорастворимым препаратам.

Способностью образовывать водорастворимые комплексы обладают и другие полимеры: полиглюкин (ПГ), поливиниловый спирт (ПВС), полиэтиленоксид (ПЭО). По увеличению эффективности солюбилизации эти полимеры располагаются в ряд: ПВП — ПГ — ПВС — ПЭО.

Запатентованы водорастворимые производные амфотерицина В с полисахаридами (инулин, декстраны, ксилан, крахмал и др.), окисленными в полиальдегид.

Наличие в полиенах свободных amino- и карбоксильных групп дает возможность получать различные их производные.

Модификации амфотерицина по аминогруппе

Большей частью *N*-ацилирование и *N*-алкилирование амфотерицина В ведет к значительному снижению токсичности, но параллельно падает активность.

Исключение составляет *N*-сукциниламфотерицин В. В виде Na-соли он хорошо растворим и активен (схема 118).



Схема 118. Строение *N*-сукциниламфотерицин В

Реакцией амфотерицина В с альдегидами были получены основания Шиффа (схема 119).

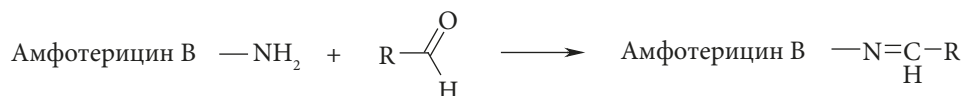


Схема 119. Реакция амфотерицина В с альдегидами

Было показано, что при получении *N*-гликозидов (схема 120) на основе амфотерицина В токсичность уменьшается, при этом активность сохраняется на уровне исходного антибиотика.

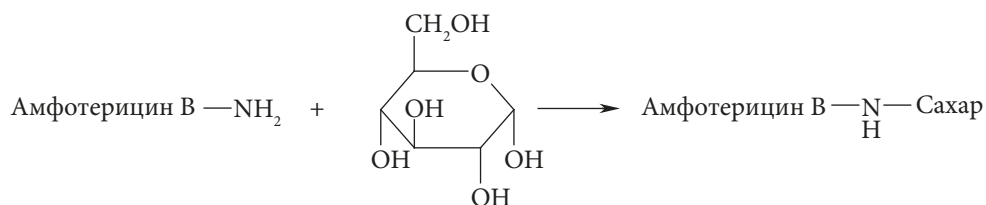


Схема 120. Реакция амфотерицина В с глюкозой с образованием *N*-гликозида

Наиболее важной реакцией по карбоксильной группе амфотерицина В является этерификация, которая проводится диазоалканами с количественным выходом (схема 121).

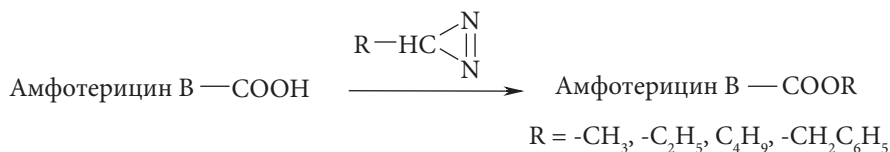
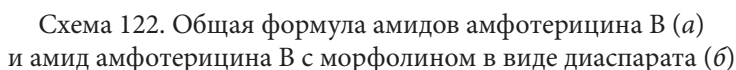


Схема 121. Этерификация амфотерицина В

Лучший результат показал метиловый эфир амфотерицина. В виде гидрохлорида он хорошо растворим в воде, значительно менее токсичен (при внутривенном введении в 6 раз, при внутривенном — в 17 раз).

Истинная растворимость метилового эфира амфотерицина в воде и увеличение его диффузионной способности привели к значительному увеличению активности в отношении липидсодержащих вирусов, включая вирусы гриппа

Кроме эфиров, получен также целый ряд алифатических амидов с прямой и разветвленной цепью до 18 атомов углерода в цепи (схема 122, а).



Также активно ведутся поиски в области создания новых лекарственных форм амфотерицина В. В настоящее время накоплен большой экспериментальный материал о превосходстве применения амфотерицина В для внутривенного введения в липосомах. Активность липосомального амфотерицина равна активности исходного амфотерицина В, при этом увеличивается химиотерапевтический индекс со значительным уменьшением токсичности. Липосомы концентрируются в очагах поражения, что приводит к более быстрой ликвидации инфекционного агента.

6.7.2. Макролиды 2-го типа

123

Кроме того, у них в кольце нет полиеновых связей и карбоксильной группы, но имеются окси- и метильные группы в различных положениях.

Макролитическое кольцо связано у этой группы антибиотиков с двумя остатками моносахаров, присоединенных раздельно к 3 и 5 атомам углерода или последовательно к С-5. Один из сахаров всегда содержит свободную аминогруппу, поэтому макролиды 2-го рода имеют основной характер.

По активности они также резко отличаются от полиенов — высокоактивны против грамположительных микроорганизмов и некоторых грамотрицательных кокков, микоплазм, крупных вирусов и являются заменителями пенициллина при возникновении пенициллиноустойчивых форм микроорганизмов.

Механизм действия макролидов 2-го типа

Механизм действия состоит в специфическом подавлении синтеза белка в клетках бактерий в результате образования комплекса с 50S субчастицами рибосом, при этом нарушаются некоторые этапы транслкации (передвижки) пептидной цепи или нарушается конформация пептидилтрансферазного центра (Р-сайта).

Эритромицин и его физиологически активные производные

Наиболее важным природным макролидом 2-го типа является *эритромицин* (Макгуайр, Ваксман, 1952). Продуцент — *Str. erythreus* — актиномицет, выделенный из почв одного из островов Филлипинского архипелага. Эритромицин — это смесь эритромицинов А, В, С, из которых А наиболее активен. Строение установлено в 1956 г. группой ученых Лилльской лаборатории. Эритромицин явился прототипом для всех природных и полусинтетических антибиотиков этого класса (схема 123).

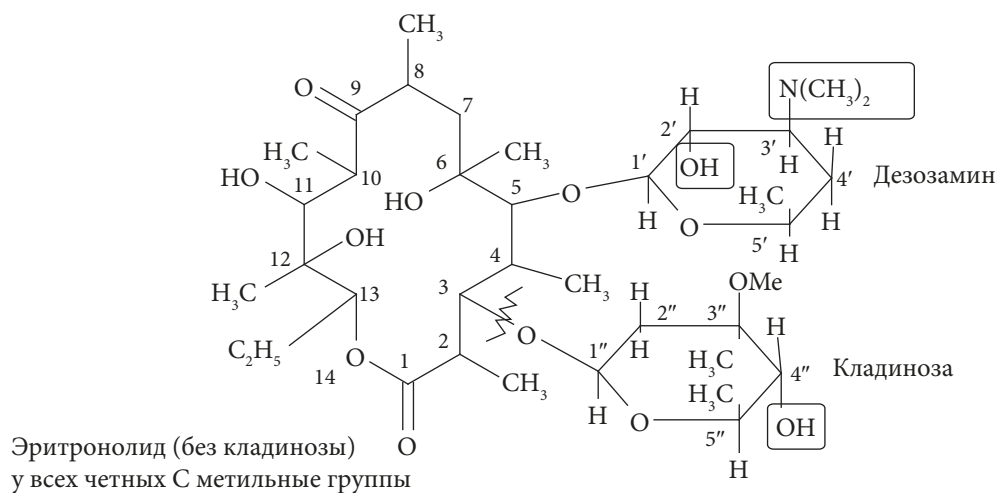
Эритромицин — это дигликозид полиоксикетолактона. Слабое основание, ($pK_a = 8,6$) за счет диметиламиногруппы в дезозамине.

Эритромицин В отличается от эритромицина А отсутствием оксигруппы в положении С-12. Биологическая активность составляет 75–80 % от активности эритромицина А.

Эритромицин С имеет другой нейтральный сахар в положении С-3 — микарозу.

Устойчивость эритромицина

Активность кристаллического эритромицина-основания сохраняется при комнатной температуре в течение одного года. Водный раствор эритромицина в концентрации 2 мг/мл сохраняет свою активность при 25 ± 5 °С в течение 5–6 дней, при 37 °С — 2 дня.



Эритромицин А

Схема 123. Строение эритромицина А

Основание устойчиво в щелочных средах до рН 11,5 и в кислых — не ниже рН 3-4. В более кислых средах происходит разложение эритромицина:

- при мягком гидролизе (0,3 н HCl, 25 мин.) отщепляется кладиноза;
- при рН 4 образуются полукетальные формы между карбонилем в положении С-9 и гидроксилом в положении С-6 (схема 124);
- при рН 2 происходит кетализация с образованием *ангидроэритромицина* (спирокетальной формы; схема 125).

По физико-химическим свойствам спирокетальная форма близка к эритромицину, но активность в 2 раза ниже и ухудшается распадаемость таблеток.

Физические свойства эритромицина

Эритромицин — это бесцветное кристаллическое вещество очень горького вкуса. Плохо (1-2 г/100 мл) растворимо в воде, хорошо — в спирте (этаноле,

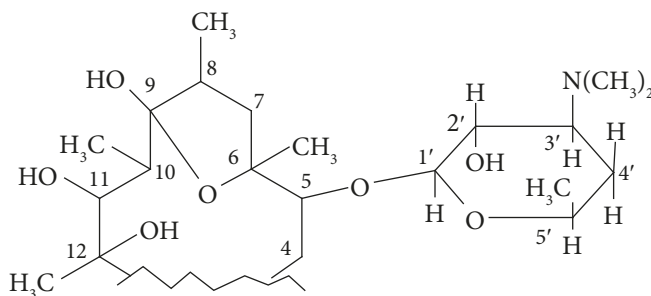


Схема 124. Фрагмент полукетальной формы эритромицина А

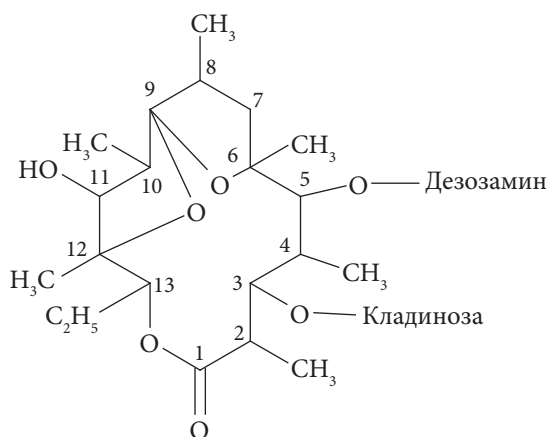


Схема 125. Изображение спирокетальной формы эритромицина А

метаноле), ацетоне, этилацетате, хлороформе, ацетонитриле, хуже — в эфире, дихлорэтаноле, амилацетате.

Основание эритромицина может находиться в трех различных кристаллических формах, отличающихся содержанием гидратной воды и температурой плавления. Две из них плавятся при температуре 130–133 °С, одна — при 190–192 °С. Активность идентична. Эритромицин легко сольватизируется. Гидратная вода удаляется при нагревании в течение 2 ч до 56 °С в вакууме (0,1 мм рт. ст.), при этом кристаллический порошок превращается в аморфный, инактивации не происходит.

Биологическая активность и спектр действия эритромицина

По спектру антибактериального действия эритромицин соответствует применяемому внутрь феноксиметилпенициллину и пероральным цефалоспорином 1-го поколения. Он активен в отношении грамположительных кокков: стафило-, пневмо-, стрепто-, гоно-, менингококков; грамположительных палочек: гемофилии, инфлуэнцы, бруцеллы и т. д.

Большим преимуществом эритромицина является высокая активность по отношению к таким внутриклеточным паразитам, как *Legionella spp.*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, *Bordetella spp.*, *Helicobacter spp.* и др., на которые β-лактамы не действуют. Эритромицин является антибиотиком первого выбора при болезни легионеров.

Эритромицин мало токсичен, легко всасывается из кишечника, в небольших количествах — из ЖКТ. Применяется для лечения заболеваний верхних дыхательных путей, ревматических пороков сердца, для профилактики ревматизма, при дифтерии, заболеваниях мочевыводящих путей, рожи, воспалении, мастите.

Эритромицин применяется вместо пенициллина при лечении инфекций, вызванных микроорганизмами, резистентными к пенициллину и при индивидуальной непереносимости пенициллина.

Эритромицин в терапевтических дозах действует бактериостатически. Устойчивость к эритромицину возникает быстро, но активность сохраняется по отношению к микроорганизмам, ставшим устойчивыми к действию пенициллинов, стрептомицина и других антибиотиков. При комбинированном применении со стрептомицином, тетрациклином и сульфаниламидами наблюдается усиление действия. Как показало исследование механизма резистентности, эритромицин теряет антимикробную активность под действием ферментов гликозиназ или фосфотрансфераз, так как под действием этих ферментов происходит замещение 2'-группы дезоамина остатком глюкозы или фосфорной кислоты. Было выдвинуто предположение, что более активные соединения могут быть получены при удалении этой группы или ее экранировании.

Эритромицин обычно применяют внутрь (*per os*), но он не слишком устойчив в кислой среде и имеет горький вкус.

Модификации эритромицина

Необходимость модификации эритромицина была вызвана двумя обстоятельствами:

- плохой растворимостью эритромицина;
- горьким вкусом.

В связи с этим было поставлено две задачи:

- получение водорастворимых производных эритромицина для парентерального введения;
- получение труднорастворимых производных, которые благодаря этому лишены горького вкуса, так как не растворимы в слюне. Они необходимы для лечения детей (в педиатрии).

Неприродные эритромицины получают только полусинтетическим путем. Для этого используют:

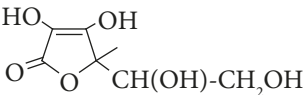
- способность эритромицина как основания давать соли с кислотами;
- способность гидроксигруппы в дезоамине ацилироваться с образованием эфиров;
- комбинацию двух вышеперечисленных способностей с образованием солей эфиров эритромицина.

При получении солей эритромицина применяли две группы кислот. К первой относятся оксикислоты, а также соляная и фосфорная кислоты (табл. 9). Эти кислоты дают хорошо растворимые соли эритромицина.

Ко второй группе относятся высокомолекулярные жирные кислоты типа стеариновой $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$, которые дают труднорастворимые соли.

Таблица 9

**Примеры аминокислот, используемых в получении солей эритромицина,
и данные о растворимости солей**

Кислота	Формула	Растворимость соли, г/100 мл
Аскорбиновая		20
Молочная	$\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$	20
Лимонная	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{HOOC-CH}_2\text{-C-CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	Нет данных
Триоксиглутаровая	$\text{HOOC-}[\text{CH(OH)}]_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$	30
Яблочная	$\text{HOOC-CH(OH)-CH}_2\text{-COOH}$	25
Винная	$\text{HOOC-}[\text{CH(OH)}]_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	35
Глюкогептановая	$\text{HOOC-(CHON)}_5\text{-CH}_2\text{OH}$	–
Соляная, фосфорная	$\text{HCl, H}_3\text{PO}_4$	–

Сложные эфиры эритромицина были получены ацилированием ОН группы в положении 2'-дезозамина.

Так при взаимодействии эритромицина с хлорангидридом пропионовой кислоты был получен пропионилэритромицин Эр-О-СО-С₂H₅. Растворимость этого соединения низкая (1 г/100 мл воды), но, по сравнению с эритромицином, он создает более высокую концентрацию в крови за счет более медленного выведения с желчью.

Среди солей эфиров эритромицина наиболее важными являются ацетил-эритромицин гидрохлорид, ацетилэритромицин ацетат, пропионилэритромицин гидрохлорид. Все они высокоактивны и растворимы.

Самым известным неприродным эритромицином является *пропионилэритромицин лаурилсульфат* (ПЭЛС; схема 126).

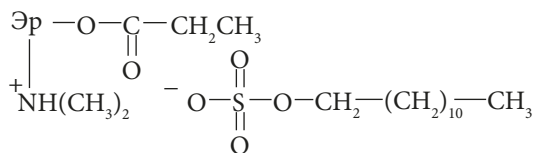


Схема 126. Строение пропионилэритромицин лаурилсульфата

Он очень хорошо всасывается, благодаря чему концентрация в крови оказывается в 3 раза выше, чем у эритромицина.

Связь между структурой и активностью эритромицинов

Исследование активности полусинтетических эритромицинов в сравнении с природными эритромицинами позволило сформулировать ряд выводов:

1. Оба гликозильных заместителя необходимы для проявления активности.
2. Модификация дезоамина (в особенности модификации аминогруппы) приводит к инактивации, возможно потому, что эта группа принимает участие в связывании с рибосомами. Сложные эфиры по гидроксильной группе в положении 2' неактивны *in vitro*, но активны *in vivo*, так как легко гидролизуются.
3. Модификации кладинозы не ведут к потере активности, видимо, эта часть молекулы не участвует в связывании с рибосомами.
4. Модификации функциональных групп в положениях лактонного кольца от 9 до 12, восстановление или замещение карбонильной группы, отщепление гидроксигруппы при С-12, ацетилирование или этерификация гидроксигруппы по положению С-11 приводят к получению продуктов, обладающих некоторой активностью.

6.7.3. Новейшие макролиды — производные эритромицина, азакиды.

Цели при создании новейших макролидов

Бурное развитие химии β -лактамов антибиотиков, внедрение в медицинскую практику большого количества цефалоспоринов широкого спектра антимикробного действия и на этом фоне нестабильность эритромицина при низких значениях pH среды (инактивируется в желудке), незначительные преимущества его производных привели к тому, что в 70-х гг. XX в. работы по получению производных эритромицина были практически свернуты. Однако примерно в это же время начинают распространяться инфекции, вызываемые внутриклеточными паразитами, передающиеся половым путем. Этот факт заставил исследователей вернуться к эритромицину как наиболее активному препарату в отношении многих внутриклеточных паразитов, при этом основные усилия были направлены на решение следующих задач:

- 1) предотвращение внутримолекулярной кетализации при низких значениях pH, ведущей к образованию неактивных соединений в кислой среде желудка;
- 2) расширение антибактериального спектра и повышение активности по сравнению со старыми макролидами;
- 3) создание новых производных с отсутствием перекрестной резистентности к ним у эритромицинорезистентных штаммов бактерий;
- 4) повышение концентрации в тех внутриклеточных «компартаментах», где могут оказаться патогены;

5) получение растворимых форм для внутривенного введения, а для педиатрии — форм, маскирующих горький вкус суспензий макролидов.

Для решения первой задачи был предпринят ряд модификаций, который привел к получению большого ряда производных эритромицина А, не теряющих активности при кислых значениях рН и обладающих многими ценными свойствами.

Так, например, блокировалась или подвергалась трансформации 9-кетогруппа эритромицина (схема 127).

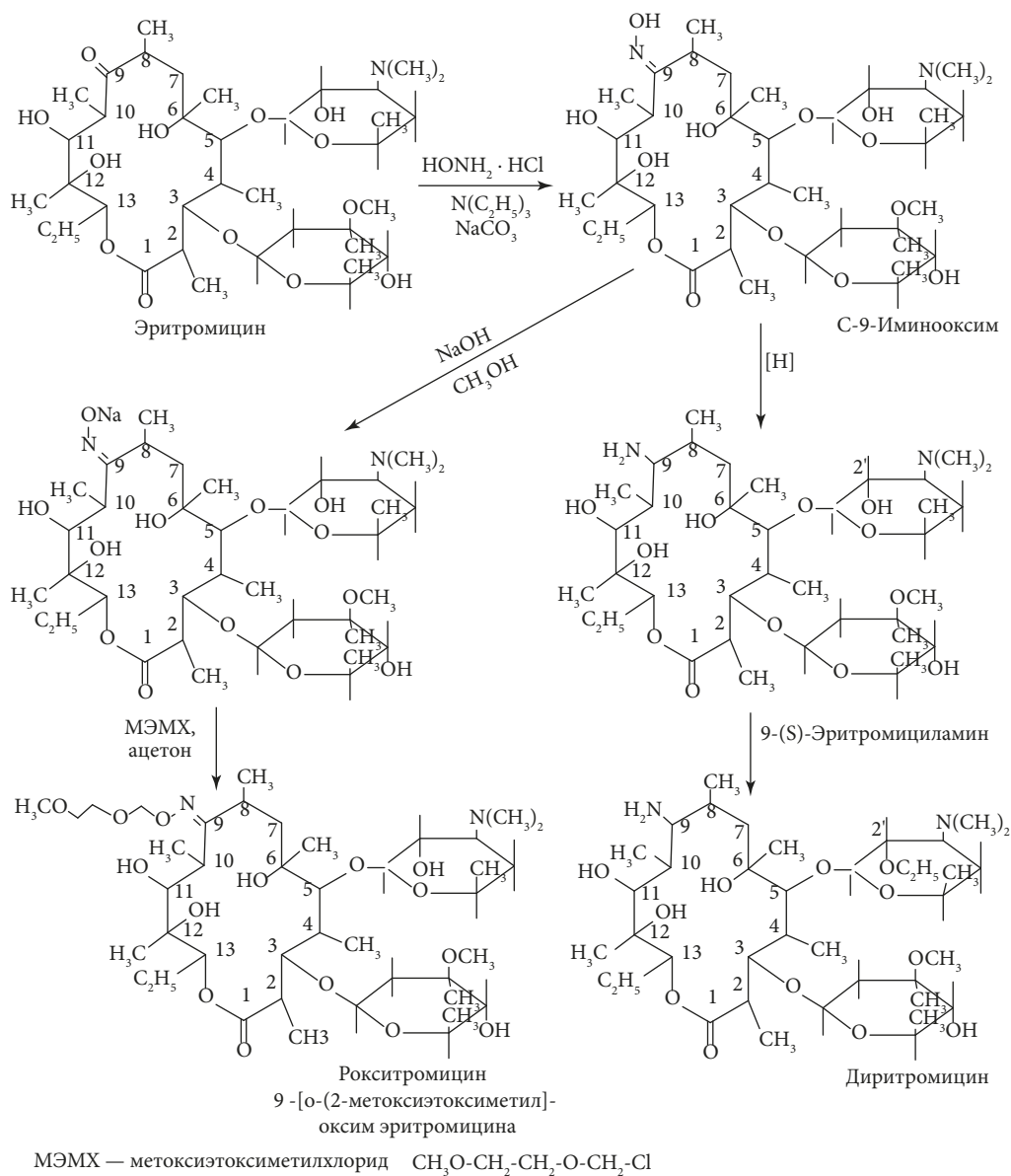


Схема 127. Превращения эритромицина с участием кетогруппы при С-9

Вследствие плохой всасываемости эритромицина было получено пролекарство — этиловый эфир по 2'-гидроксилу дезозамина — *диэритромицин*.

Деградация эритромицина А предотвращается также заменой протона в метильной группе при С-8 на фтор (схема 128).

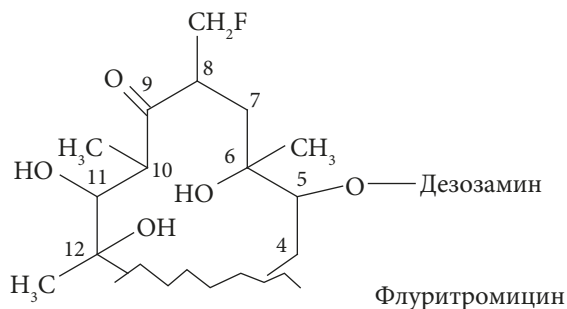


Схема 128. Фрагмент молекулы флуэритромицина

Флуэритромицин был получен как химическим методом, так и биоконверсией.

Внутримолекулярная кетализация предотвращается защитой гидроксильных групп в положениях С-6 и С-12 этерификацией (после защиты гидроксильной группы в сахарах $(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$). 6-О-метильный эфир эритромицина А — *кларитромицин* — имеет большую стабильность в кислой среде, чем исходный антибиотик (схема 129).

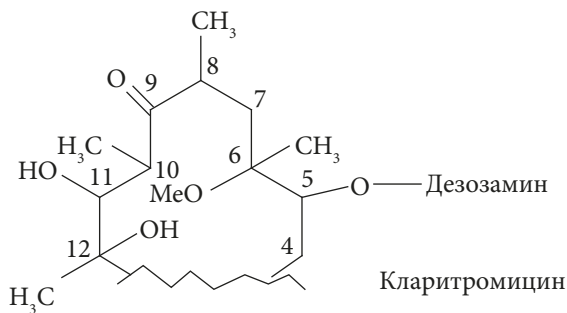


Схема 129. Фрагмент молекулы кларитромицина

Активны также 6,12-диметильные эфиры эритромицина А. Примерно в 2 раза активнее оказался 11,12-дикарбамат — *даверцин* (схема 130).

Тем же свойством обладают представители 11,12-дикарбаматов, у которых азот карбаматной группы замещен различными группами.

Перегруппировка по Бекману С-9-оксимного производного привела к серии азалидов, наиболее активный из них — *азитромицин*. Схема синтеза азитромицина из эритромицина приведена на схеме 131.

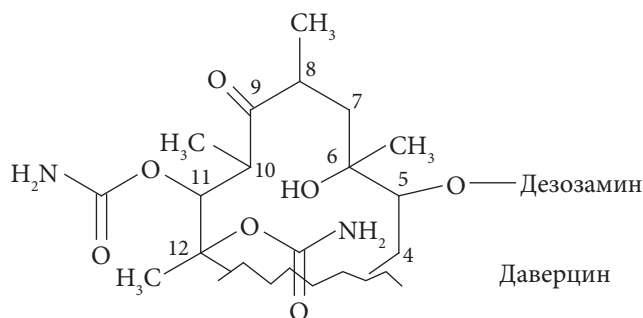


Схема 130. Фрагмент молекулы даверцина

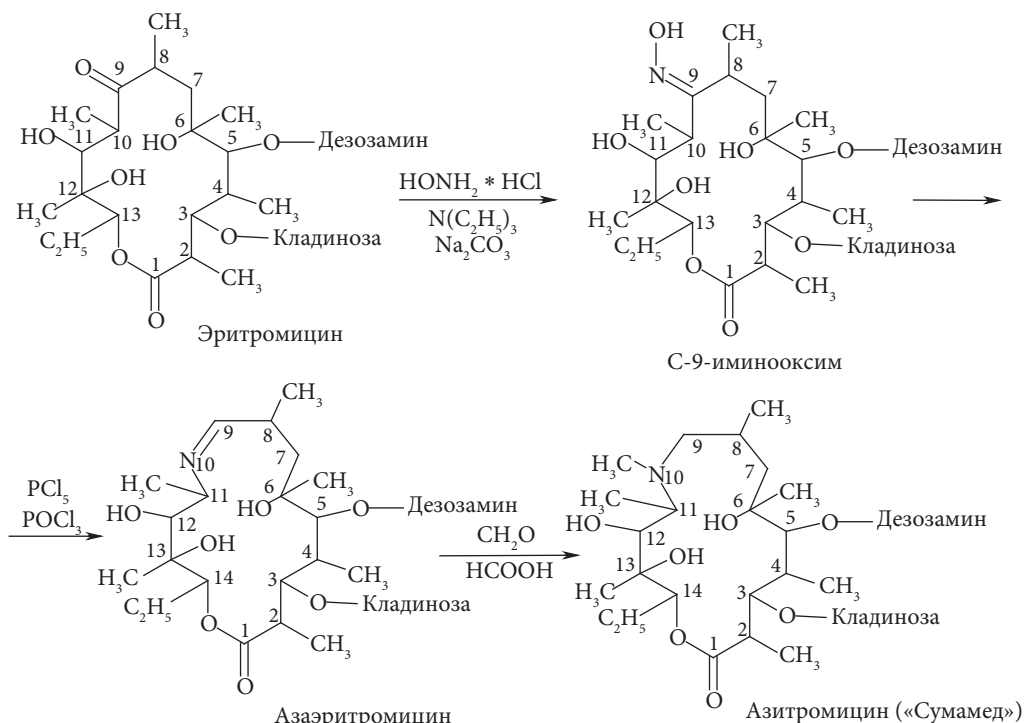


Схема 131. Синтез азитромицина

Антимикробная активность и особенности фармакокинетики современных макролидов

1. Основной особенностью фармакокинетики современных макролидных антибиотиков является более полное их всасывание из ЖКТ, быстрое и широкое тканевое распределение, медленная элиминация из тканей, способность накапливаться и длительно сохранять эффективные концентрации в тканях после приема внутрь.

В наиболее высоких концентрациях они обнаруживаются в тканях легких, слизистой бронхов, печени, тканях женских половых органов, тканях предстательной железы, миндалин, слизистой желудка и др.

Азитромицин дает также высокие концентрации в тканях глаза и мозга и назначается к применению при инфекциях этой локализации.

2. Второе достоинство — большой период полувыведения ($T_{1/2}$): Так, эритромицин характеризуется периодом полувыведения 2 ч, а азитромицин и рокситромицин — свыше 10 ч после однократного приема и до 40 ч после многократного.

3. Современные макролиды накапливаются в лизосомах различных типов клеток, в том числе макрофагов крови, фибробластов, полинуклеарах, которые с током крови доставляют их в очаг инфекции. В очаге инфекции под влиянием клеточных и бактериальных энзимов происходит их высвобождение в инфицированные ткани, т. е. накопление макролидов в клетках макроорганизма повышает бактерицидную активность его защитных систем.

4. Современные макролиды обладают хорошей переносимостью. Частота побочных реакций (желудочно-кишечные расстройства) колеблется в пределах 1–5 %, в то время как для эритромицина — 5–14 %.

5. Меньше по сравнению с другими антибиотиками (особенно β -лактамами) угнетают нормальную микрофлору организма человека. Сохранение защитного барьера нормальной микрофлоры снижает риск развития суперинфекций и распространения устойчивости.

6. Благодаря длительному поддержанию в тканях эффективных концентраций, возможно их применение 1–2 раза в сутки при курсах терапии меньшей длительности: 3–5 дней — для азитромицина и 7–10 и более — для эритромицина.

Таким образом, удобство применения (1–2 раза в сутки), меньшая частота развития побочных реакций, высокая эффективность, в том числе при инфекциях, вызываемых атипичными возбудителями, уравнивают экономические показатели лечения новыми макролидами и старыми, такими как эритромицин, несмотря на их более высокую рыночную стоимость.

Новые полусинтетические макролиды расширили возможности лечения инфекций дыхательных путей (верхних и нижних), кожи, мягких тканей, мочеполовой системы и других локализаций, вызываемых грамположительными микроорганизмами, многими анаэробами, атипичными бактериями.

Азитромицин успешно применяется для лечения хламидиальных инфекций, рокситромицин — для профилактики церебральной токсоплазма и микоплазменных пневмоний у ВИЧ-инфицированных больных. Также в клинике активно применяют диритромицин и кларитромицин.

6.8. Антибиотики полипептиды

Полипептидные антибиотики — большая и разнородная группа природных БАВ, содержащих в своей молекуле аминокислоты (АК), связанные пептидными связями.

В отличие от белков полипептидные антибиотики обладают рядом особенностей:

- имеют меньшую молекулярную массу (примерно 10^3 Да);
- содержат в составе аминокислоты не только L- но и D-ряда;
- а также специфические аминокислоты сложного и необычного строения ($N\text{-CH}_3$ -аминокислоты, β -аминокислоты);
- непептидные фрагменты (гетероциклы, остатки сахаров и т. д.);
- отличаются характером структуры самой пептидной цепи (линейные, циклические пептиды, циклопептиды с линейной боковой цепочкой).

Поскольку структура их весьма разнообразна, систематизируют производные в зависимости от состава и характера связи между фрагментами (схема 132).

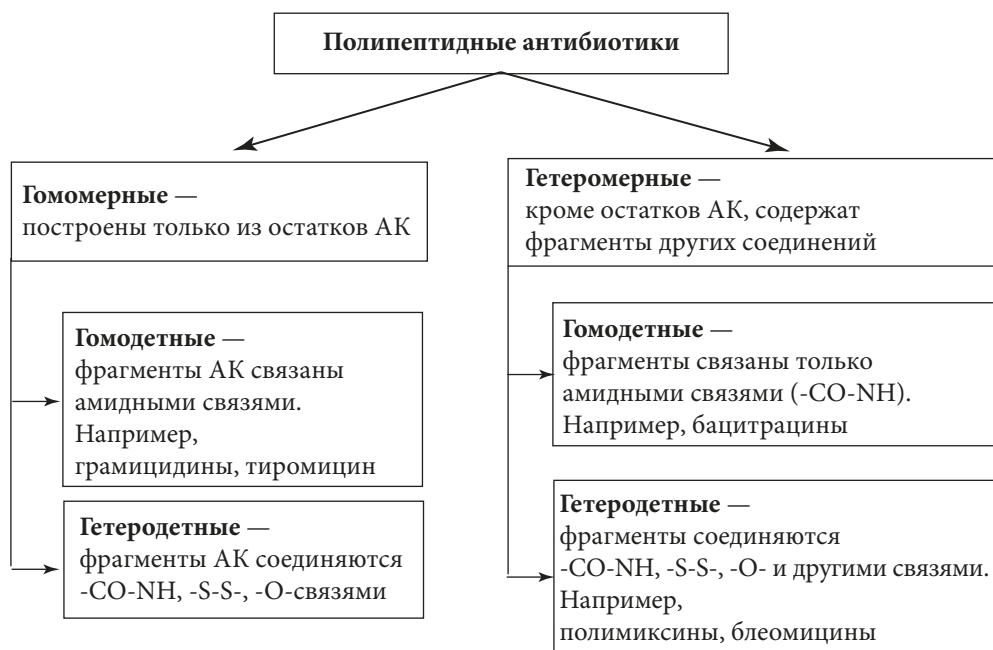


Схема 132. Классификация полипептидных антибиотиков

Продуцентами полипептидных антибиотиков являются различные виды микроорганизмов:

- споровые бактерии (в основном род *Bacillus*);
- актиномицеты;
- несовершенные грибы.

Их выделено более 300. Многие нашли применение:

- в медицине для лечения инфекционных заболеваний и как противоопухолевые препараты;
- в народном хозяйстве (для повышения продуктивности с/х животных, в пищевой промышленности).

6.8.1. Грамицидины

Грамицидин С (S) выделен в 1942 г. Г. Ф. Гаузе и М. Г. Бражниковой. Продуцентом является спорообразующая бактерия *Bacillus brevis*.

Молекула грамицидина С построена из двух одинаковых пентапептидов, соединенных по типу «голова — хвост» (схема 133). Это гомомерный гомодетный декапептид.

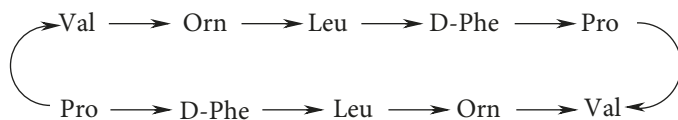


Схема 133. Краткое схематическое обозначение строения грамицидина

Установлено пространственное строение молекулы грамицидина С (S). Структура относится к антипараллельному β -складчатому листу и обладает исключительной жесткостью благодаря водородным связям (схема 134). Заряженные и гидрофобные группы ориентированы по разные стороны от плоскости листа.

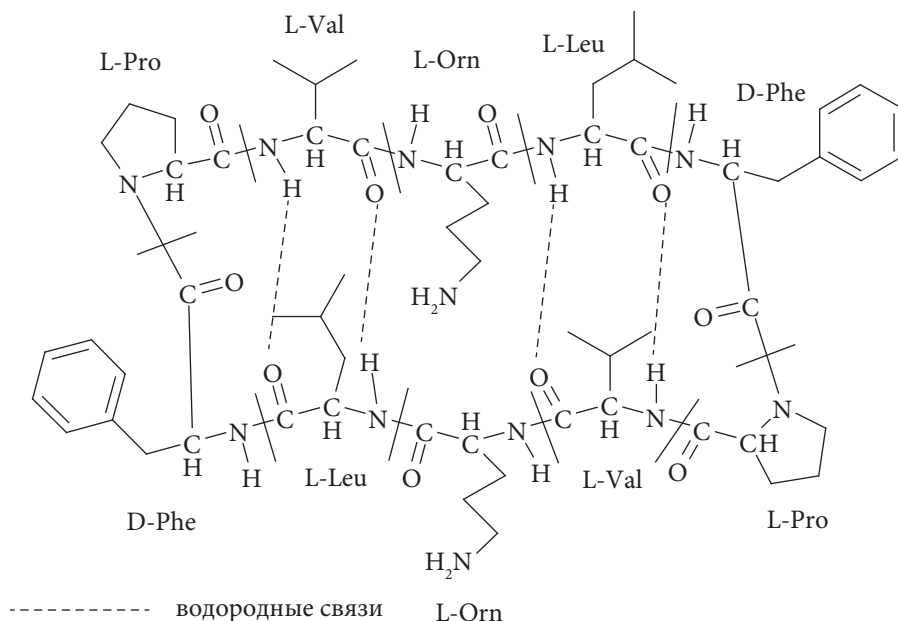


Схема 134. Химическое строение грамицидина С

Полный синтез грамицидина С (S) осуществлен в 1956 г. Р. Швайзером и П. Зибером.

Благодаря наличию двух свободных аминогрупп орнитина, грамицидин С обладает основными свойствами, дает соли с минеральными кислотами. В медицине применяют гидрохлориды, пикраты.

Основание и гидрохлорид в воде не растворимы, дают коллоидальные опалесцирующие растворы.

Молекула устойчива, гидролиз проходит в жестких условиях. Его коллоидные водные растворы не теряют активности при нагревании в автоклаве при 120 °С в течение 30 мин.

Применяется в виде 2 %-ного спиртового раствора — прозрачной жидкости светло-желтого, опалесцирующего и сильно пенящегося при взбалтывании.

Антимикробный спектр и применение

Грамицидин С обладает довольно высокой антибиотической активностью в отношении грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий. Задерживает рост стрептококков, стафилококков, пневмококков, возбудителей анаэробной инфекции, палочек дифтерии, коклюша, дизентерии, кишечной палочки, протей.

Применяется для лечения гнойных ран и ожогов, при гнойном плеврите, скарлатине, дифтерии, бациллярной дизентерии. Для лечения эрозий шейки матки и кольпитов. Противопоказан для парентерального введения (из-за гемолиза). С другой стороны, не способен всасываться из желудочно-кишечного тракта. Поэтому применяется только местно. Терапевтическая доза 0,01–10 мкг/мл.

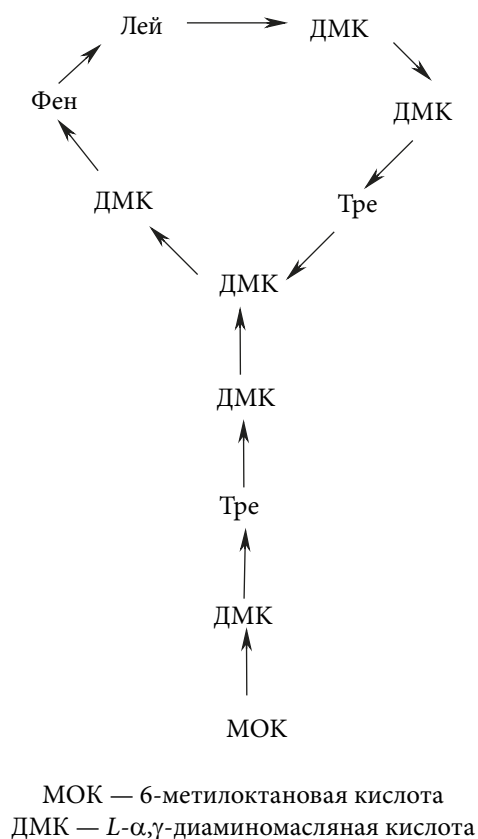
Механизм действия грамицидина

Заключается в нарушении структуры и функций ЦПМ. Мембранная активность грамицидина С (S) обусловлена электростатическими взаимодействиями NH_2 групп орнитина с фосфатными группами фосфолипидов мембраны. При этом образуется липид-грамицидиновый комплекс, обладающий свойствами ПАВ, что сопровождается структурной перестройкой мембран, их «разрыхлением».

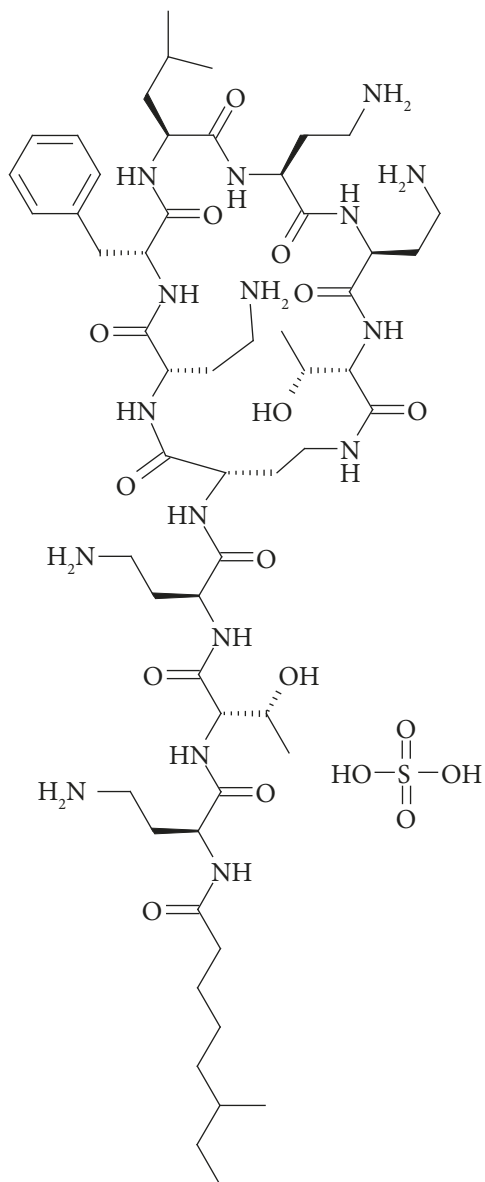
6.8.2. Полимиксины

Известно несколько полимиксинов, продуцентами которых являются *Bacillus polymyxa*, *Bacillus circulans*. Наиболее изучен полимиксин В. Это гетеромерный и гомодетный декапептид (схема 135).

Полимиксин В обладает основными свойствами благодаря наличию в молекуле пяти аминогрупп. В сухом состоянии он устойчив в виде гидрохлоридов и сульфатов.



a



b

Схема 135. Схематическое (*a*) и химическое (*б*) строение полимиксина В

Антимикробный спектр и применение

Полимиксины избирательно действуют на грамотрицательные бактерии, на грамположительные действуют слабо. По-видимому, это связано с тем, что в мембранах грамположительных бактерий присутствует холестерин и в больших количествах гликолипиды, которые защищают клетки от полимиксинов.

Применяется полимиксин В при лечении кожных заболеваний, менингитов, инфекций верхних дыхательных путей, мочеполового тракта.

Механизм действия полимиксинов

Эти антибиотики обладают сродством к отрицательно заряженным фосфолипидам клеточных мембран, изменяя их ионную проницаемость, в результате клетка теряет ионы K^+ .

6.8.3. Бацитрацины

Бацитрацины впервые были выделены в 1945 г. Б. Джонсоном из культуры *Bac. licheniformis*. Сейчас установлено, что это смесь из 10 индивидуальных антибиотиков, основную долю из которых (37 %) составляет бацитрацин А (схема 136). Это гетеромерный и гомодетный полимер (10 АК и производное тиазола).

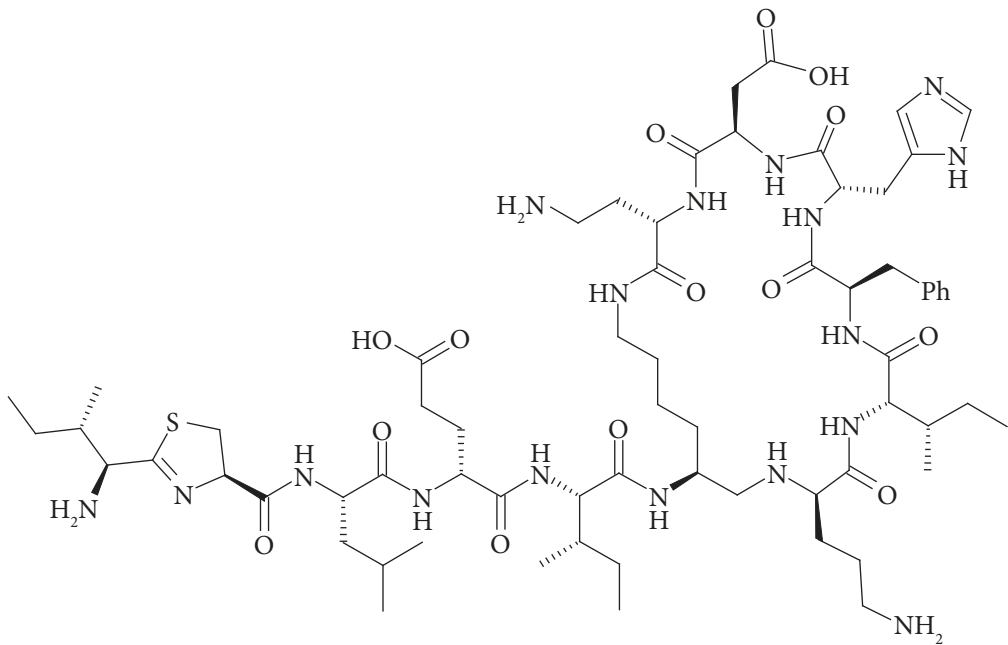


Схема 136. Строение бацитрацина А

Антимикробный спектр и применение

Бацитрацин А обладает высокой активностью в отношении грамположительных бактерий и почти не действует на грамотрицательные. По спектру действия он близок к пенициллинам, но действует на пенициллиноустойчивые штаммы и к нему практически не наблюдается появления резистентных штаммов.

Бацитрацин А малотоксичен, но многократное парентеральное введение его вызывает функциональные изменения в почках. Поэтому применяется в основном местно при лечении гнойных инфекций кожи, роговицы глаз. В сельском хозяйстве используется в качестве консерванта, его добавляют в силос и кормовые смеси.

6.8.4. Актиномицины

Актиномицин был выделен в 1941 г. из культуральной жидкости продуцента *Streptomyces antibioticus* З. Ваксманом и Х. Вудвордом. Он представляет собой смесь более 20 антибиотиков. Состоят они из феноксазиновой хромофорной группы — актиномицина и пептидных боковых цепей. Наиболее интересными оказались актиномицин С и D. Актиномицин С применяется для лечения лейкозов, лимфогранулематоза, рака яичников. Препараты актиномицина D (космоген, дактиномицин) используются в медицине для лечения рака Вильмса и эмбриональной рабдомиосаркомы.

Механизм действия актиномицинов

Противоопухолевая активность этих антибиотиков обусловлена их способностью образовывать комплексы с гуанидинсодержащими участками спиральной ДНК. При этом подавляется матричная активность ДНК и, как следствие, ингибируется синтез РНК.

6.8.5. Блеомицины

Эти противоопухолевые антибиотики впервые были выделены в Японии в 1966 г. Продуцент *Str. verticillus* вырабатывает целый комплекс блеомицинов (примерно 15 компонентов). По классификации блеомицины — это гетеромерные и гетеродетные полипептиды гликопептидной природы.

Механизм их биологического действия аналогичен актиномицинам — взаимодействие с ДНК опухолевой клетки и подавление процессов репликации и транскрипции.

Применяют блеомицины в терапии плоскоклеточного рака легкого, слизистой оболочки рта, языка, гортани, пищевода, а также в комбинации с другими препаратами для лечения злокачественных новообразований мозга.

6.9. Анзамицины

Антибиотики *анзамицины* получили практическое значение относительно недавно. Они имеют циклическую структуру, напоминающую структуру макролидов. Циклическая часть их молекулы состоит из ароматической группировки

(«ядро») и алифатической цепи («ручка»), причем кольцо замыкается амидной группой, т. е. эти соединения являются лактамами, а не лактонами. В зависимости от природы ароматической части они делятся на два класса: содержащие бензольное ядро и содержащие нафталиновое ядро (схема 137).

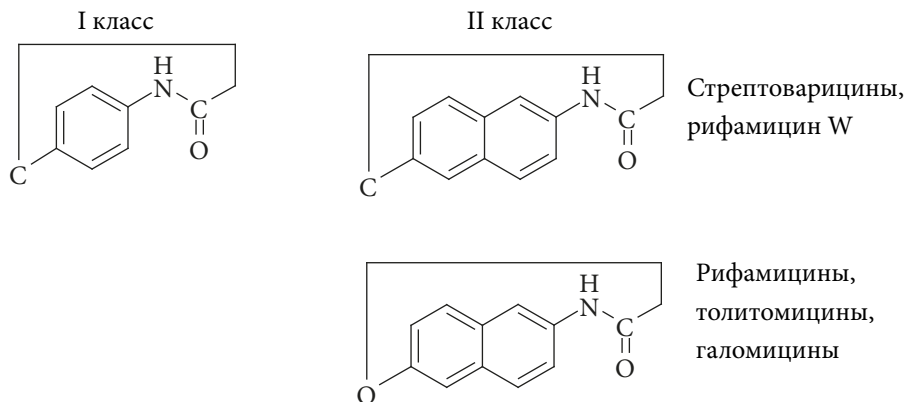


Схема 137. Схематическое изображение
и представители различных классов анзамицинов

Анзамицины I класса не обладают избирательной активностью и являются токсичными. Изучается возможность их применения в качестве противоопухолевых препаратов.

Анзамицины II класса можно разделить на группы. У анзамицинов первой группы алифатическая цепь присоединяется к нафталиновому ядру С–С связью. У анзамицинов второй группы — простой эфирной связью. Наиболее важной является именно эта группа анзамицинов и среди них антибиотик *рифамидин*.

Первые природные рифамицины были выделены в 1958 г. Пьеро Сенци с соавт. Продуцентом является лучистый грибок-проактиномицет *Nocardia mediterranea*. Они представляют собой комплекс, состоящий не менее чем из пяти антибиотиков: А, В, С, D и Е. Наиболее стабильным компонентом в этом комплексе является рифамидин В. При определенных условиях ферментации можно получить только рифамидин В (схема 138).

Он обладает умеренной активностью в отношении грамположительных бактерий и микобактерий туберкулеза.

Механизм действия рифамицинов

Рифамицины подавляют синтез РНК у бактерий путем образования комплекса с ферментом — ДНК-зависимой РНК-полимеразой (нарушение процесса транскрипции). Этот механизм отличается от механизма действия других антибиотиков, что обуславливает отсутствие перекрестной резистентности к ним у возбудителей.

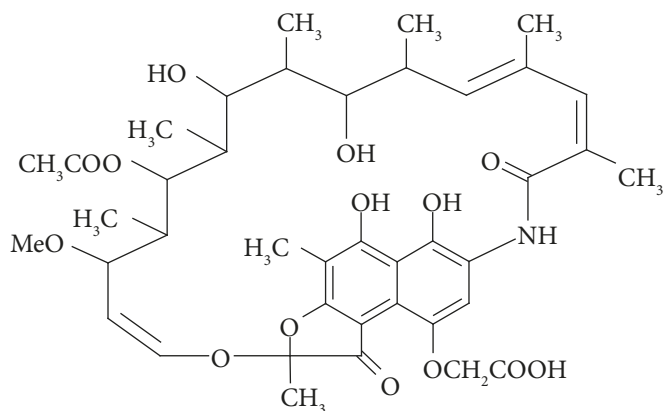


Схема 138. Строение рифамицина В

Было установлено, что со временем активность разбавленных растворов рифамицина увеличивается, это свидетельствовало о возможном превращении данного антибиотика в более активные производные. Были выяснены промежуточные продукты этих превращений и конечный продукт — рифамицин SV. В настоящее время рифамицин SV можно получить полусинтезом и биосинтезом с использованием мутантных штаммов *Nocardia mediterranea*.

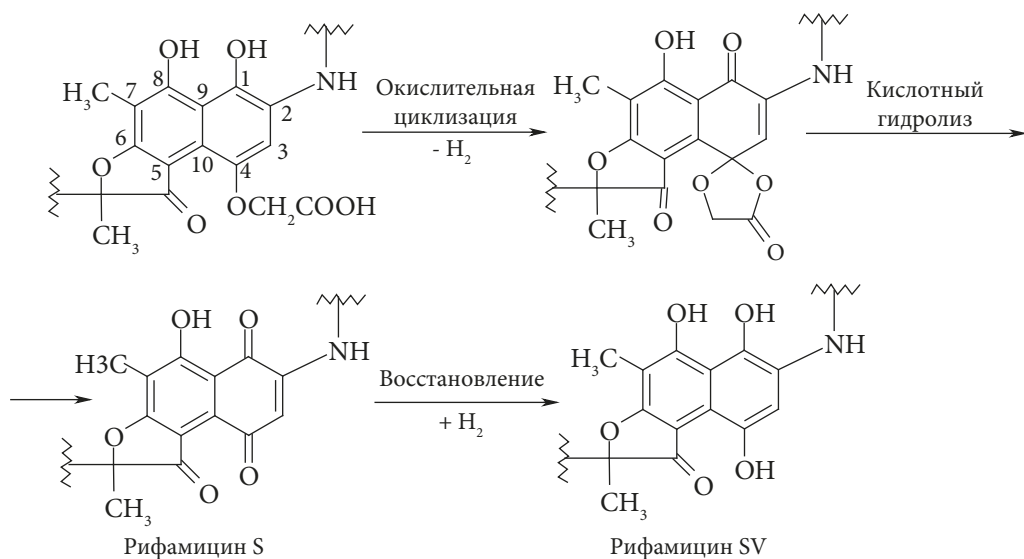


Схема 139. Превращения, протекающие в водных растворах рифамицина В

Рифамицин S — высокоактивен в отношении грамположительных бактерий и микобактерий туберкулеза. Но самый активный из них рифамицин SV. Ценным свойством его является способность подавлять развитие грамположительных бактерий, приобретших устойчивость к пенициллину, эри-

тромицину, новобиоцину, олеандомицину, стрептомицину. По силе действия на стафилококки, стрептококки превосходит цефалоспорины, тетрациклины, аминогликозиды. Малотоксичен.

Однако рифамицин SV имеет ряд недостатков:

- неэффективен при приеме *per os*;
- слабо активен в отношении грамположительных бактерий;
- быстро выводится с желчью, что приводит к нестабильности уровня антибиотика в тканях.

Это побудило исследователей к поиску новых полусинтетических рифамицинов.

Пути химической модификации рифамицинов

В 1965 г. химической модификацией рифамицина SV был получен полусинтетический антибиотик рифампицин (схема 140).

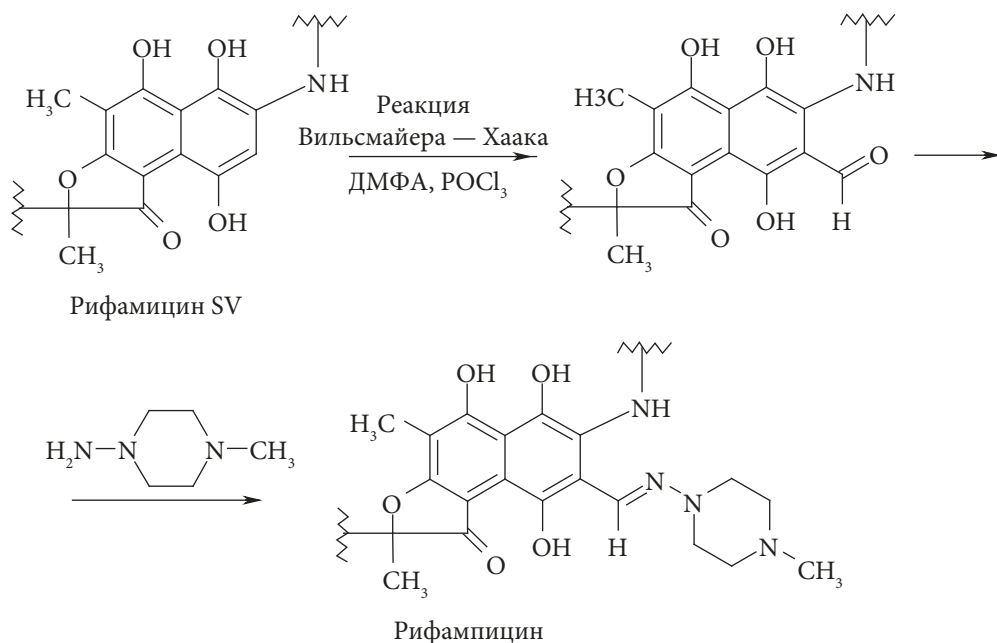


Схема 140. Получение рифампицина

Рифампицин имеет широкий антибактериальный спектр (грамположительные и грамотрицательные бактерии). К нему чувствительны сибиреязвенные палочки, патогенные клостридии, протей, бруцеллы, палочка лепры, риккетсии, микобактерии туберкулеза. Рифампицин характеризуется благоприятными фармакокинетическими характеристиками, хорошо проникает внутрь тканей и клеток, ингибируя размножение внутриклеточно расположенных возбудителей. Благодаря хорошему распределению в организме, высоко эффективен при

тяжелых гнойно-септических процессах, вызванных чувствительными к нему бактериями. Очень эффективен при лечении туберкулеза — применяется во всем мире. Используется и для лечения проказы.

Также рифампицин стимулирует фагоцитарную активность макрофагов, полинуклеаров, т. е. повышает иммунитет.

Рифампицин создает в крови и органах высокие концентрации, которые в течение длительного времени сохраняются на терапевтическом уровне, т. е. обладает пролонгированным действием.

Выявлена высокая эффективность рифампицина при профилактике и лечении экспериментальной чумы.

Другим важным для клиники препаратом является *рифамид* (диэтиламид рифамицина В; схема 141).

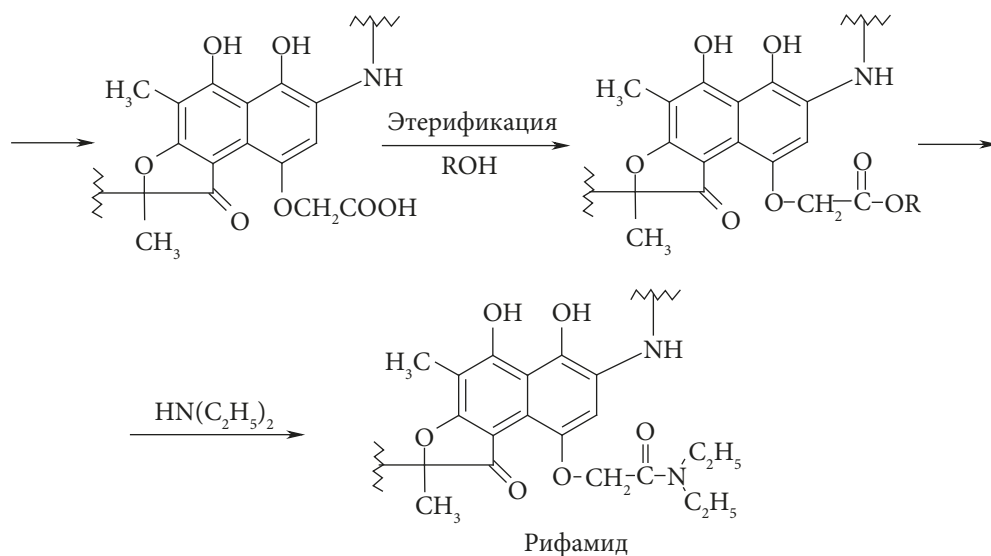


Схема 141. Получение рифамида

Рифамид имеет более высокий терапевтический индекс, чем рифамицин SV.

Связь между строением и действием в ряду рифамицинов

1. Модификация гидроксильных групп в нафталиновом кольце в положениях С-1, С-8 и в алифатической цепи (С-21 и С-23) приводит к инактивации, за исключением окисления ОН группы при С-1 до -С=О (карбонила).

2. Модификации, приводящие к изменению пространственной ориентации этих гидроксильных групп, также ведут к инактивации. Вероятно, они принимают участие в образовании связей с РНК-полимеразой.

3. Замещение в положении С-3 или С-4 ароматического ядра на карбоксильную группу уменьшает антибактериальную активность. Основные заместители

увеличивают активность в отношении грамотрицательных бактерий. Другие заместители не влияют на исходную активность, но могут изменять физико-химические свойства, такие биологические характеристики, как всасывание, распределение в организме, проникновение в клетки бактерий.

4. Восстановление сопряженных двойных связей в цепи и деацетилирование не приводят к снятию активности.

7. ИЗМЕРЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ

Активность антибиотиков — это способность подавлять рост микроорганизмов. Биосинтетические методы получения антибиотиков не могут гарантировать постоянное количество активного начала в единице веса. Активность получаемых антибиотиков зависит от целого ряда причин:

- 1) продуктивности применяемого штамма;
- 2) условий проведения процесса ферментации;
- 3) условий проведения химочистки;
- 4) сушки антибиотиков;
- 5) условий их хранения.

Вот почему в весовой единице сухого вещества может содержаться разное количество антибиотика в пересчете на 100 %. Поэтому *качество* антибиотика определяется всегда *биологической активностью*, т. е. степенью воздействия определенного количества антибиотика на определенный штамм микроорганизма, принятый за стандарт.

Активность оценивается или путем непосредственного подсчета числа клеток микроорганизмов в единице объема, или с помощью измерения какого-либо параметра культуры, коррелирующего с плотностью популяции, например, рассеяния света.

С 1944 г. биологическая активность выражается в условных единицах действия (ED), или в (ME) — международной единице действия, имеющей весовую величину.

ED — минимальное количество антибиотика, способное подавлять развитие тест-микроба в определенной концентрации.

Так, первая оксфордская единица активности соответствовала минимальному количеству пенициллина, которое, будучи растворено в 50 мл питательного бульона, задерживало рост золотистого стафилококка штамм 209 с образованием стерильных колец $d = 2-5$ см.

1 ME пенициллина = 0,6γ (мкг) чистой кристаллической натриевой соли пенициллина ($1\gamma = 10^{-3}$ мг — микрограмм, 10^{-9} кг).

Для остальных антибиотиков МЕ совпадают с весовой, т. е. $1 \text{ МЕ} = 1 \mu$ чистого вещества. Однако для некоторых антибиотиков за МЕ принимается 1μ солянокислой соли (антибиотики тетрациклинового ряда), для других 1μ — основания антибиотиков (эритромицин, стрептомицин и др.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Без сомнения, эра антибиотиков сыграла существенную роль в жизни современного общества и позволила спасти миллионы человеческих жизней. Недаром открытие антибиотиков сравнивают по значимости с открытием атомной энергии. Современные антибиотики имеют широкий спектр антибактериального действия, есть антибиотики, действующие на возбудителей грибковых, вирусных инфекций, противоопухолевые антибиотики. Внедрение антибиотиков способствовало развитию таких областей медицины, как пересадка тканей и органов, травматология. Некоторые антибиотики применяются для диагностики злокачественных опухолей.

Также антибиотики широко применяются в ветеринарии, животноводстве и птицеводстве для лечебных и профилактических целей, в сельском хозяйстве для защиты растений от болезней, борьбы с клещами, грызунами и т. д.

Применяют их в пищевой и консервной промышленности, виноделии, сыроварении, в деревообрабатывающей промышленности — в качестве фунгицидов (для борьбы с грибом, разрушающим дерево).

Шестьдесят лет эры антибиотиков показали, что значение этих биологически активных веществ в медицине и других областях неуклонно растет. Предполагается, что и в дальнейшем антибиотики останутся главными продуктами среди фармацевтических препаратов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Антибиотики против туберкулеза: история // Медицинская энциклопедия [Электронный ресурс]. URL: <https://med-wiki.com/infectious/antibiotiki-protiv-tuberkulyoza-istoriya> (дата обращения: 20.12.2019).
2. Lister Joseph, Lister Baron // National Portain Gallery : сайт. URL: <https://www.npg.org.uk/collections/search/portrait/mw98490> (дата обращения: 20.12.2019).
3. Жизненные этапы выдающегося биолога Ильи Ильича Мечникова // Тамбовское областное государственное бюджетное учреждение «Научная медицинская библиотека» : сайт. URL: <http://medlib.miac.tambov.gov.ru/node/1063> (дата обращения: 20.12.2019).
4. Токин Б. П. Целебные яды растений. 2-е изд., доп. Ленинград : Лениздат, 1974.
5. Пастеризация // Википедия : Свободная энциклопедия : сайт. URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Пастеризация#/media/File:Louis_Pasteur.jpg (дата обращения: 20.12.2019).
6. Александр Флеминг: биография, личная жизнь, достижения, фото : сайт. URL: <https://fb.ru/article/420262/aleksandr-fleming-biografiya-lichnaya-jizn-dostijeniya-foto> (дата обращения: 20.12.2019).
7. 15 most significant events in the 20th century // Timetoast : сайт. URL: <https://www.timetoast.com/timelines/15-most-significant-events-in-the-20th-century> (дата обращения: 20.12.2019).
8. Смирнов В. В. Антибиотики и/или пробиотики: размышления и факты // Медицинская картотека. 1998. № 8.
9. Антибиотики цефалоспорины 3-го поколения в таблетках. Цефалоспорины III поколения. Резистентность и микроорганизмы // Medatlant : сайт. URL: <https://i0.wp.com/lor.guru/images/125535/deistvie-antibiotikov.jpg> (дата обращения: 20.12.2019).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках : учебник / Н. С. Егоров. — Москва : Изд-во МГУ : Наука, 2004. — 528 с. — ISBN 5-211-04669-2.

Биотехнология : учебное пособие для студентов высших учебных заведений / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехова, И. И. Чакалева ; под ред. А. В. Катлинского. — Москва : Академия, 2006. — 256 с. — ISBN 978-5-7695-5506.

Прищеп Т. П. Основы фармацевтической биотехнологии : учебное пособие / Т. П. Прищеп, В. С. Чучалин, К. Л. Зайков, Л. К. Михалева, Л. С. Белова. — Ростов на Дону : Феникс; Томск : Изд-во НТЛ, 2006. — 256 с. — ISBN 5-222-08883-9.

Учебное издание

Глухарева Татьяна Владимировна
Селезнева Ирина Станиславовна
Уломский Евгений Нарциссович

ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

Учебное пособие

Заведующий редакцией *М. А. Овечкина*
Редактор *В. И. Попова*
Корректор *В. И. Попова*
Компьютерная верстка *В. К. Матвеев*

Подписано в печать 29.03.2021 г. Формат 70 × 100 1/16.
Бумага офсетная. Цифровая печать. Усл. печ. л. 12,26.
Уч.-изд. л. 9,5. Тираж 100 экз. Заказ 69

Издательство Уральского университета
Редакционно-издательский отдел ИПЦ УрФУ
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4
Тел.: +7 (343) 389-94-79, 350-43-28
E-mail: rio.marina.ovechkina@mail.ru

Отпечатано в Издательско-полиграфическом центре УрФУ
620083, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4
Тел.: +7 (343) 358-93-06, 350-58-20, 350-90-13
Факс: +7 (343) 358-93-06
<http://print.urfu.ru>

Для заметок

Для заметок

